

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



PARTICIPACION DE LA ANGIOTENSINA II  
EN EL RECLUTAMIENTO DE CELULAS INFLAMATORIAS  
Y EN LA FIBROSIS RENAL

Director: Dr. Jesús Egido de los Ríos

TESIS DOCTORAL

MARTA RUIZ ORTEGA

Madrid, 1996



ARCHIVO

*A mi madre*

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Nefrología  
de la Fundación Jimenez Díaz  
bajo la dirección del Dr. Jesús Egido de los Ríos  
profesor titular de la U.A.M.

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

Avda. de los Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)  
28040 - MADRID

Don Jesús Egido de los Ríos, Doctor en Medicina y Profesor Titular de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

### CERTIFICA

Que Doña Marta Ruiz Ortega, Licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección las experiencias necesarias para la realización de la presente Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmo la presente en Madrid, a 30 de Abril de 1996.



Fdo. Director: Dr. Jesús Egido de los Ríos



Fdo. Doctorando: Marta Ruiz Ortega



## Agradecimientos

---

A Jesús Egido, director de esta tesis, quiero agradecerle haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, puerta de entrada al mundo de la investigación científica, así como su estímulo constante durante la realización de este trabajo.

A los Drs. Luis Hernando Avendaño y Santos Casado, Jefes Sucesivos del Servicio de Nefrología de la Fundación Jimenez Díaz, por su apoyo al trabajo científico desarrollado en el laboratorio.

A la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, y al Ministerio de Educación y Ciencia, por la concesión de las becas que me han permitido llevar a cabo esta Tesis Doctoral.

A Parke-Davis España, por la concesión del proyecto de I+D, que ha financiado parte de estos estudios.

A la distintas organizaciones, que a través de la concesión de premios han financiado parte de la labor investigadora realizada por nuestro grupo, porque continúe su aportación desinteresada en este área.

A todos mis compañeros del laboratorio que de una o otra manera han contribuido al desarrollo de este trabajo. En particular a mis "maestras" Carmen B, Carmen G y Silvia por todo el tiempo dedicado, por su cariño, paciencia y amistad.

También quiero agradecer a Eva Gonzalez el apoyo y la atención que me dedicó durante estos años.

A mi madre, por su espíritu de sacrificio y por apoyarme en mi elección de trabajar en el mundo de la investigación.

A mis amigos, que tanto me han ayudado a olvidarme de todo lo aquí reflejado, gracias por hacerme perder el tiempo disfrutando de la vida. En especial a Miguel por tantas horas de conversación que me han ayudado a crecer.

Por último, a todos esos seres pequeños, peludos, de brillantes ojos rojos, sin cuya existencia y sacrificio nada de lo aquí presente podría haber sido llevado a su fin, que vuestro espíritu nos perdone.

Este trabajo ha sido publicado parcialmente en *J Hypertens* (Involvement of Angiotensin II and Endothelin on matrix protein production and renal sclerosis, 12 (suppl 4) S51-S58, 1994), *Kidney Int* (ACE inhibition reduces proteinuria, glomerular lesions and extracellular matrix production in a normotensive rat model of immune complex nephritis, 48:1778-1791, 1995) y *Hypertension* (Effects and interactions of Endothelin-1 and Angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth, 27:885-892, 1996).

Otros trabajos están en revisión o sometidos a publicación en *J Am Soc Nephrol* (ACE inhibitor quinapril decreases the preproendothelin mRNA expression in a normotensive model of immune nephritis) y *Kidney Int* (Platelet activating factor stimulates the expression and synthesis of extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. Role of TGF- $\beta$ ).

Partes de este trabajo han sido presentadas a las siguientes reuniones:

- Congress of the American Society of Nephrology. San Diego, 1995.
- International Congress of Nephrology. Madrid 1995.
- Congress of the American Society of Nephrology. Orlando, 1994.
- Congress of the American Society of Nephrology. Boston, 1993.

Partes de este trabajo han recibido los premios:

- Premio del Congreso de la EDTA, Amsterdam 1996 por el trabajo: "Angiotensin II triggers monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), transforming growth factor (TGF- $\beta$ 1) and matrix protein gene expression in mesangial cells and interstitial renal fibroblast". EDTA European Renal Association, Amsterdam 1996.
- Premio Hospal de investigación 1995. "La inhibición del enzima convertidor de la angiotensina disminuye la expresión génica de la endotelina en un modelo de nefritis por inmunocomplejos".
- Premio de Investigación Cilag 1994. "La administración de Quinapril previene las lesiones glomerulares en ratas normotensas con nefritis por inmunocomplejos".
- Premio de Investigación Cilag 1993. "Efecto de la Angiotensina II y la Endotelina sobre la síntesis de proteínas de matriz por células mesangiales en cultivo. Una complicada red de interacciones".

Estudios recientes sugieren que el sistema renina-angiotensina (RAS) está implicado en la patogenia del daño glomerular e intersticial en situaciones asociadas a hipertensión. En este trabajo hemos estudiado (A) la participación del RAS local en la patogenia del daño renal en un modelo normotenso de nefritis por inmunocomplejos y (B) el papel potencial de la AngII en el control del número de células (proliferación de células residentes y reclutamiento de células mononucleares) y en el acúmulo de matriz extracelular, aspectos claves en la progresión de las enfermedades renales.

En un modelo de nefritis inmune hemos determinado el efecto del quinapril, un iECA de alta fijación tisular, en la evolución clínica y morfológica. Las ratas con nefritis desarrollaron síndrome nefrótico, intensa proliferación celular y lesiones glomerulares y tubulointersticiales. La presión sanguínea permaneció en el rango normotenso durante las tres semanas de estudio. La administración de quinapril a ratas con lesiones glomerulares (proteinuria entre 20-50 mg/día) previno el desarrollo de proteinuria intensa y disminuyó las lesiones morfológicas. En los animales con nefritis existió una activación y redistribución de los componentes del RAS tisular, caracterizado por un aumento en la expresión génica de la ECA y del angiotensinógeno, una redistribución del receptor AT<sub>1</sub> y un incremento de la actividad de la ECA. Los mecanismos del efecto beneficioso de los iECA en la progresión de la enfermedad renal no son aún bien conocidos. En la corteza renal de las ratas con nefritis hubo un aumento significativo en la expresión y síntesis de proteínas de matriz extracelular (fibronectina y colágenos) y en la expresión génica de factores implicados en el daño renal (TGF- $\beta$ 1, preproendotelina-1 y MCP-1), que disminuyó en respuesta al quinapril. La actividad de la ECA en la corteza renal se inhibió un 68% en los animales tratados, lo que sugiere que el efecto beneficioso observado podría deberse a la modulación de la generación local de AngII y sus efectos sobre el crecimiento celular y la síntesis de proteínas de matriz y de citoquinas.

En estudios *in vitro* hemos demostrado que la AngII actúa sobre las células mesangiales y los fibroblastos intersticiales renales, vía receptor AT<sub>1</sub>, induciendo un aumento en la proliferación celular, en la síntesis de proteínas de matriz (fibronectina) y de citoquinas proinflamatorias (MCP-1) y profibrogénicas (TGF- $\beta$ ). Estos datos sugieren que la AngII podría participar, a través de la liberación de estas citoquinas, en el reclutamiento de células mononucleares y en el acúmulo de matriz extracelular. Asimismo, diversos factores asociados al desarrollo del daño renal en este modelo (como TNF- $\alpha$ , PAF e inmunocomplejos de IgG) aumentan la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub> en células mesangiales.

En conjunto, estos resultados sugieren que en situaciones de daño renal, asociadas o no hipertensión, la activación del RAS local participa en la patogenia de las enfermedades renales. Una producción local elevada de AngII durante un cierto tiempo podría ser causa de fibrosis renal. Nuestros datos proporcionan nueva información sobre la importancia de modular el sistema renina-angiotensina tisular en la progresión de la enfermedad renal.

<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>1. PROGRESIÓN DEL DAÑO RENAL: FISIOPATOLOGÍA.....</b>	<b>1</b>
1.1. Mesangio glomerular	
1.2. Fibroblastos en el daño renal	
1.3. Células infiltrantes en el daño renal	
<b>2. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (RAS).....</b>	<b>8</b>
2.1. Renina	
2.2. Angiotensinógeno	
2.3. Enzima de conversión de la angiotensina	
2.4. Angiotensinasas	
2.5. Péptidos de degradación de la angiotensina	
2.6. Receptores de angiotensina	
2.6.1. Receptor AT <sub>1</sub>	
2.6.2. Mecanismos de actuación intracelular del receptor AT <sub>1</sub>	
<b>3. COMPONENTES DEL RAS EN EL RIÑÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>4. FARMACOLOGIA DEL RAS.....</b>	<b>15</b>
<b>5. PARTICIPACION DEL RAS EN EL DAÑO RENAL.....</b>	<b>18</b>
<b>6. ANGII Y RIÑÓN.....</b>	<b>20</b>
6.1. Mecanismos hemodinámicos	
6.2. Mecanismos de actuación intracelular de la AngII en células mesangiales	
<b>7. PAPEL DE LA ANGII EN LA ESCLEROSIS RENAL.....</b>	<b>21</b>
7.1. AngII y proliferación de células renales	
7.2. AngII y matriz extracelular	
7.3. AngII y factores de crecimiento	
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>

<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>1. METODOLOGIA EMPLEADA EN EL MODELO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>25</b>
1.1. Diseño experimental	
1.2. Estudios clínicos. Bioquímica	
1.3. Determinación de la presión arterial	
1.4. Procesamiento del tejido renal	
1.4.1. Aislamiento de glomérulos	
1.4.2. Aislamiento de las membranas del borde en cepillo de las células epiteliales tubulares	
1.5. Medidas de la actividad de la ECA	
1.6. Análisis estadístico de los resultados	
<b>2. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS RENALES.....</b>	<b>27</b>
2.1. Morfología Renal	
2.2. Inmunohistoquímica	
2.2.1. Depósitos de inmunocomplejos	
2.2.2. Infiltrado mononuclear	
2.2.3. Proteínas de matriz extracelular	
2.3. Cuantificación de los resultados	
<b>3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....</b>	<b>29</b>
3.1. Extracción de RNA celular y tisular	
3.2. Análisis de Northern blot	
3.3. Análisis de dot blot	
3.4. Prehibridación e hibridación	
3.5. Sondas empleadas. Marcaje	
3.6. Hibridación <i>in situ</i>	
3.6.1. Ribosondas empleadas. Marcaje	
3.7. Estudios de RT-PCR	
3.7.1. Reacción de transcripción inversa (RT)	
3.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
3.8. Análisis densitométrico y expresión de resultados	
<b>4. CULTIVOS CELULARES.....</b>	<b>33</b>
4.1. Cultivo de células mesangiales	
4.2. Líneas celulares	
<b>5. ESTUDIOS DE UNIÓN DE ANGII.....</b>	<b>34</b>
<b>6. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....</b>	<b>34</b>
6.1. Incorporación de <sup>3</sup> H-Timidina al DNA	
6.2. Proliferación con azul de metileno	
6.3. Análisis del ciclo celular	

7. ESTUDIOS DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.....	35
7.1. Cuantificación de la síntesis de fibronectina	
7.2. Determinación de TGF- $\beta$ 1 por bioensayo	
7.2.1 Medio condicionado	
7.2.2 Bioensayo de TGF- $\beta$	
7.3. Determinación de MCP-1 por Western blot	
7.3.1 Medio condicionado	
7.3.2 Ensayo de Western blot	
7.4. Análisis estadístico	
8. MEDIDA DE CALCIO INTRACELULAR.....	38
9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR NF- $\kappa$ B.....	38
9.1. Extracción de proteínas nucleares	
9.2. Ensayo de retardo de movilidad electroforética	
9.2.1. Ensayo de unión	
9.2.2. Marcaje del oligonucleótido consenso	
10. LISTA DE REACTIVOS.....	39
RESULTADOS.....	40
PARTE I. ESTUDIOS IN VIVO.....	40
1. EFECTO DE LA INHIBICION DE LA ECA.....	40
1.1. Evolución de la enfermedad	
1.2. Evolución clínica en respuesta al tratamiento con quinapril	
1.2.1. Evolución de la proteinuria y de la función renal	
1.2.2. Parámetros bioquímicos	
1.2.3. Tensión arterial	
1.3. Estudios morfológicos	
1.3.1. Estudios de microscopía óptica	
1.3.2. Localización de los depósitos inmunes	
1.3.3. Infiltrado inflamatorio	
2. ESTUDIO DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.....	49
2.1. Estudio de la actividad de la enzima de conversión de la angiotensina	
2.1.1. Actividad en suero y en tejido renal	
2.1.2. Localización de la actividad en el tejido renal	
2.1.3. Efecto del tratamiento con iECA	

2.2. Regulación génica de los componentes del RAS en tejido renal	
2.2.1. Expresión de la ECA	
2.2.2. Expresión del Ao	
2.2.3. Expresión del receptor AT <sub>1</sub>	
3. PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR EN LAS RATAS CON NEFRITIS INMUNE EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON QUINAPRIL.....	55
3.1. Estudio de proteínas de matriz extracelular mediante inmunohistoquímica	
3.2. Expresión de proteínas de matriz extracelular	
4. CITOQUINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO.....	58
4.1. Expresión renal del TGF-β1.	
4.2. Expresión renal de la preproendotelina-1	
4.3. Expresión renal del MCP-1	
 PARTE II. ESTUDIOS IN VITRO.....	63
1. PAPEL DE LA ANGIOTENSINA II EN LA PATOGENIA DE LA ESCLEROSIS RENAL.....	63
1.1. Estudio de la interacción AngII y células mesangiales	
1.1.1. Efecto de la AngII sobre la proliferación celular	
1.1.2. Efecto de la AngII sobre la expresión y síntesis de proteínas de matriz extracelular	
1.1.2.1. Efecto de la AngII sobre la expresión de proteínas de matriz extracelular	
1.1.2.2. Efecto de la AngII sobre la síntesis de proteínas de matriz extracelular	
1.1.2.3. Papel del TGF-β en la síntesis de FN inducida por AngII	
1.1.2.4. Papel de la activación de la proteína quinasa C (PKC) en los fenómenos inducidos por AngII	
1.1.2.5. Papel del PAF en la síntesis de FN inducida por AngII	
1.1.2.6. Papel de la ET-1 en la síntesis de FN inducida por AngII	
1.2. Estudio de la interacción AngII y citoquinas en células mesangiales	
1.2.1. Efecto en la proliferación celular	
1.2.2. Efecto en la síntesis de proteínas de matriz extracelular	
1.2.2.1. Efecto de la coincubación de AngII y citoquinas en la síntesis de FN	
1.2.2.2. Efecto en la expresión de FN. Mecanismos de regulación	
1.2.2.3. Estudio de los mecanismos de la interacción AngII e IL-1β en la síntesis de FN	
1.2.2.4. Papel de la activación de la PKC en este fenómeno	
1.3. Estudio de la interacción AngII y fibroblastos intersticiales	
1.3.1. Caracterización del receptor presente en los fibroblastos intersticiales renales	

1.3.2. Señales intracelulares	
1.3.3. Efectos metabólicos relacionados con el crecimiento y la matriz extracelular	
1.3.3.1. Demostración de que la AngII es un factor de crecimiento	
1.3.3.3. Efecto de la AngII en la expresión y síntesis de proteínas de matriz extracelular	
1.3.3.4. Efecto de la AngII en la expresión de factores de crecimiento	
2. PAPEL DE LA ANGIOTENSINA II EN EL RECLUTAMIENTO CELULAR.....	94
2.1. Expresión de sustancias quimiotácticas en células mesangiales	
2.2. Síntesis de MCP-1	
2.3. Regulación del gen del MCP-1	
2.4. Papel de la activación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B en la expresión del MCP-1 inducida por la AngII.	
2.4.1. Activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en respuesta a la estimulación con AngII.	
2.4.2. Participación de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en la expresión del mRNA del MCP-1 inducida por la AngII.	
2.5. Efecto de la AngIII en la expresión de MCP-1	
2.6. Expresión de MCP-1 células monocíticas.	
3. REGULACION DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA POR DIFERENTES ESTIMULOS EN CÉLULAS RENALES.....	100
3.1. Regulación del mRNA del receptor AT <sub>1</sub> de la Angiotensina en células mesangiales	
3.1.1. Efecto del TNF- $\alpha$	
3.1.2. Efecto de los agregados solubles de inmunoglobulinas	
3.1.3. Efecto del PAF	
3.2. Regulación del mRNA del angiotensinógeno en células renales	
<b>DISCUSION.....</b>	<b>104</b>
1. EFECTO DE LA INHIBICION DE LA ECA EN UN MODELO NORMOTENSO DE NEFRITIS INMUNE.....	104
2. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN EL DAÑO RENAL....	104
2.1 Estudio de los componentes del RAS en el modelo de nefritis inmune	
2.1.1. Actividad de la ECA	
2.1.2. Efecto de la inhibición de la ECA	
2.1.3. Expresión génica de los componentes del RAS en las ratas con nefritis	
2.1.3.1. Expresión de la ECA	
2.1.3.2. Expresión del Angiotensinógeno	
2.1.3.3. Expresión del receptor AT <sub>1</sub>	
2.2. Regulación de los componentes del RAS por factores implicados en el daño renal en el modelo de nefritis inmune. Estudios <i>in vitro</i>	



<b>3. MECANISMO DEL EFECTO BENEFICIOSO DE LOS INHIBIDORES DE LA ECA.....</b>	<b>108</b>
3.1. Efecto hemodinámico	
3.2. Efecto sobre el atrapamiento de macromoléculas	
3.3. Efecto sobre el sistema de quininas	
3.4. Efecto de la AngII en la progresion del daño renal	
3.3.1. Papel de la AngII en la glomeruloesclerosis renal	
3.3.2. Papel de la AngII en la fibrosis intersticial renal	
3.3.3. Efecto de la AngII en la síntesis y expresión de citoquinas y factores de crecimiento	
3.3.3.1. Papel del TGF- $\beta$	
3.3.3.2. Papel de la endotelina	
3.3.3.4. Papel del factor activador de las plaquetas (PAF)	
3.3.4. Mecanismos de regulación de la matriz mesangial en respuesta a la estimulación con AngII	
3.3.5. Interacción entre AngII y citoquinas en células mesangiales	
3.3.6. Papel de la AngII en el reclutamiento celular	
3.3.7. Efecto de la AngII en células mesangiales	
 <b>CONCLUSIONES.....</b>	 <b>120</b>
 <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	 <b>122</b>

## **INTRODUCCION**

## 1. PROGRESIÓN DEL DAÑO RENAL: FISIOPATOLOGÍA

Con frecuencia las enfermedades renales progresan a insuficiencia renal terminal, independientemente de la persistencia de la causa original. La mayor parte de las enfermedades renales progresivas presentan lesiones morfológicas comunes (revisado en Klahr et al., 1988). Las estructuras celulares especializadas son reemplazadas por fibroblastos y matriz extracelular. El glomérulo presenta una pérdida de capilares, áreas localizadas de proliferación celular y esclerosis progresiva. Además, existe infiltrado de células inflamatorias, en particular monocitos y linfocitos, en el glomérulo y en el intersticio renal, atrofia tubular y fibrosis intersticial. Todo esto conduce a la pérdida de las funciones de filtración, reabsorción y secreción del riñón y, en definitiva, a la insuficiencia renal terminal.

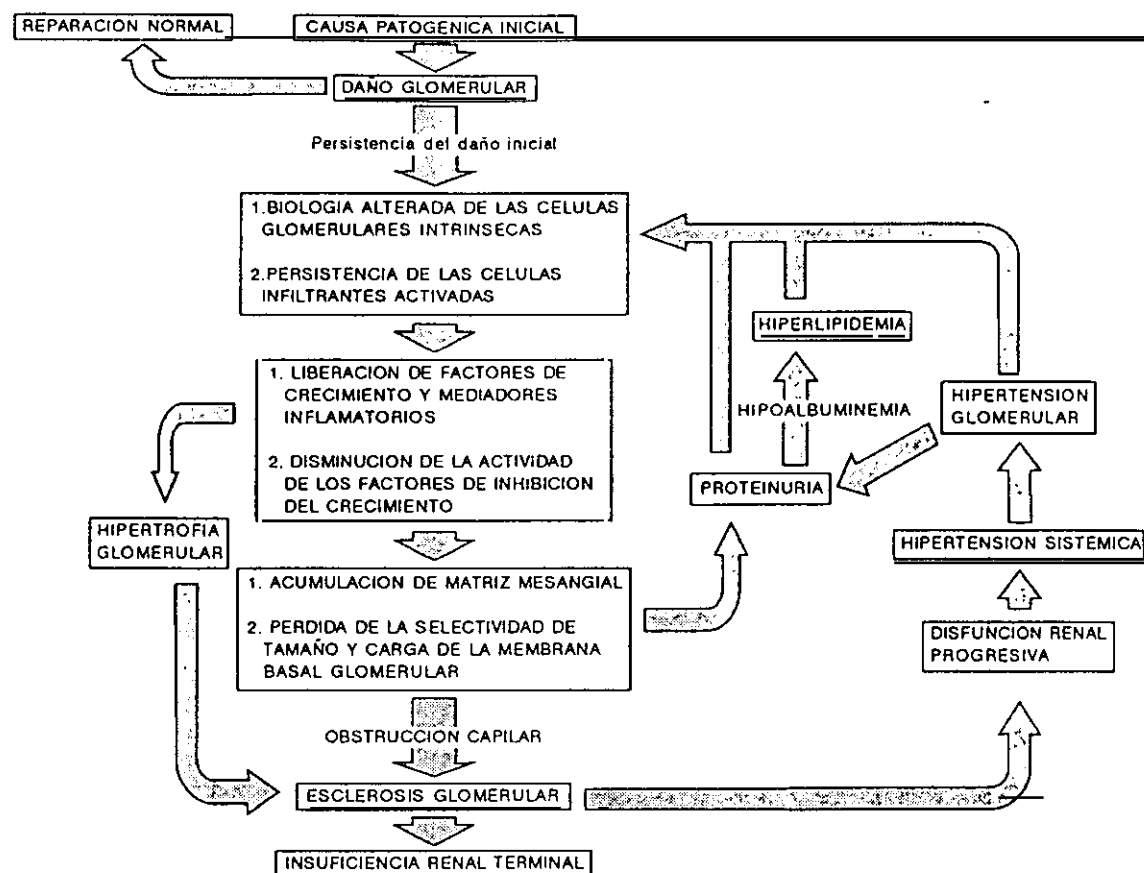
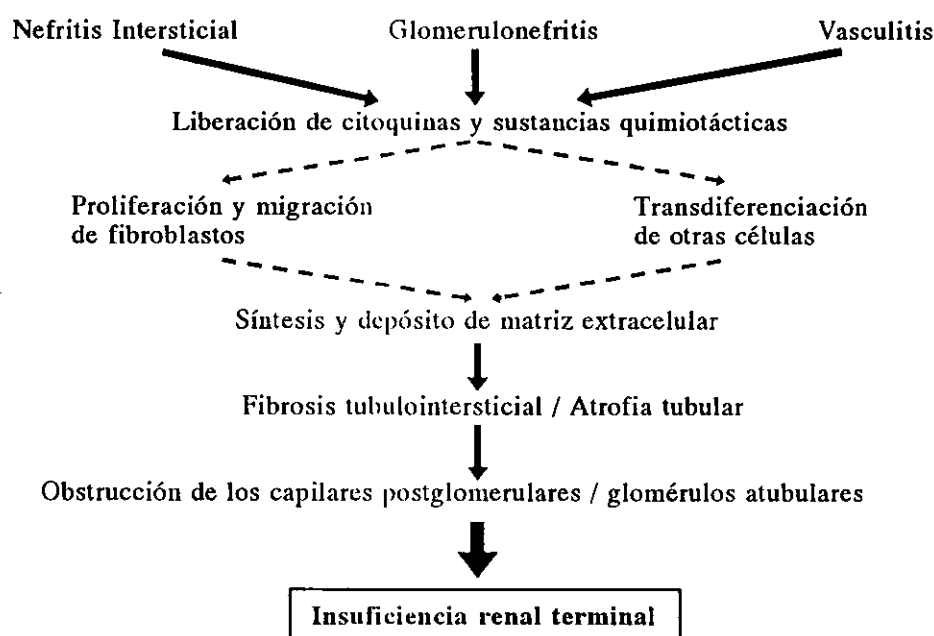


Figura 1. Esquema del daño renal.

En las últimas dos décadas se han propuesto un gran número de hipótesis que intentan explicar la naturaleza del daño renal progresivo. A comienzo de los 80, Brenner y sus colaboradores postularon que los cambios adaptativos hemodinámicos a nivel glomerular que se producen en una situación de reducción en la masa renal funcional podrían jugar un papel importante en el origen de la glomeruloesclerosis (Hostetter et al., 1981). A pesar de sus limitaciones, esta teoría ha tenido un gran valor al abrir una nueva línea de investigación en este campo, llevando a plantear diversas hipótesis

para explicar los mecanismos que conducen a la lesión glomerular (figura 1). Todos estos estudios han mostrado similitudes entre los procesos de glomeruloesclerosis y ateroesclerosis (revisado en El Nahas, 1995) en los que se atribuye un papel central a los factores de crecimiento en la progresión del daño tisular. En la década de los 90 se ha renovado el interés en el estudio de la patogenia de la fibrosis tubulointersticial. Diversos trabajos han mostrado que la progresión de las enfermedades renales crónicas depende a menudo de la severidad de la afectación tubulointersticial más que de la extensión de la glomeruloesclerosis (revisado en Bohle et al., 1994a). En la figura 2 se muestra la hipótesis más aceptada del mecanismo de la insuficiencia renal terminal.



**Figura 2.** *Hipótesis del desarrollo de la insuficiencia renal terminal.*

Aunque los mecanismos últimos que participan en la progresión del daño renal no se conocen, numerosos estudios sugieren que algunas hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y lípidos bioactivos (tabla 1), liberadas por células infiltrantes y residentes glomerulares, influyen en la proliferación de células mesangiales e intersticiales, y en el depósito de matriz extracelular (revisado en Jacobson, 1991, Ortiz et al., 1994). Entre los factores de crecimiento implicados en el desarrollo de la fibrosis renal destacan el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor transformante de crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Estos factores se han detectado en los glomérulos lesionados en una gran variedad de nefropatías y su administración o la transfección de sus genes da lugar a un incremento en la matriz extracelular (Isaka et al., 1993). Asimismo, el tratamiento con antagonistas o anticuerpos neutralizantes frente a ellos atenúa la severidad de las nefritis (Ross et al., 1986; Border et al., 1992).

Tabla 1. Algunos factores implicados en el daño renal progresivo.

	Fuente <sup>#</sup>	Diana <sup>#</sup>	Acción
<i>Factores de crecimiento</i>			
TGF- $\beta$	M $\phi$ , CM plaquetas	CM, CEnd, CEG, Fibroblastos	Estimula o inhibe el crecimiento celular. Estimula la síntesis de matriz extracelular (FN, proteoglicanos, colágenos), inhibe colagenasas, aumenta la expresión de integrinas
PDGF	Plaquetas, CEnd, CM, M $\phi$	Fibroblastos CM, CMLV	Mitogénico para las células diana, liberación de IGF por fibroblastos, síntesis de proteínas de matriz por CM, secreción de colágeno por células del túbulo proximal
FGF	CEnd, M $\phi$ , cerebro, riñón?	CM, CMLV, CEnd, Fibroblastos	Mitogénico, angiogénesis, se une a heparina
EGF	CM, CET	Fibroblastos CM, CET	Mitogénico
<i>Citoquinas</i>			
IL-1 $\beta$	M $\phi$ , CM	CM, fibroblastos	Mitogénico?, síntesis de proteínas de matriz extracelular y citoquinas
TNF- $\alpha$	M $\phi$ , CM	CM, CEG fibroblastos	Mitogénico?, síntesis de matriz extracelular (FN, proteoglicanos) y citoquinas
IL-6	M $\phi$ , CM, CEnd	CM	Mitogénico, síntesis de FN
<i>Hormonas</i>			
AngII <sup>*</sup>	Circulación, túbulo proximal glomérulo	CM, CET	Mitogénico?, hipertrofia de células tubulares, síntesis de proteínas de matriz extracelular vasoconstricción renal, contracción mesangial.
ET-1	CEnd, CET, CM	CM, CMLV	Mitogénico, contracción mesangial, vasoconstricción renal, síntesis de FN
<i>Lípidos</i>			
PAF	CM, CEG	CM, CEG, fibroblastos	Mitogénico, síntesis de proteínas matriz extracelular (FN, proteoglicanos)
TxA <sub>2</sub>		CM	Síntesis de proteínas matriz extracelular y de TGF $\beta$
<i>Otros</i>			
NO		CMLV	Vasodilatador, antiproliferativo para células vasculares
Bradiquinina		CM, CMLV, CEnd	Vasodilatador, mitógeno para CM, antiproliferativo en la pared vascular, síntesis de NO

## Notas:

<sup>\*</sup>Los efectos de la AngII se comentan con mayor detalle en apartados posteriores.

<sup>#</sup>Sólo se citan las fuentes/dianas relevantes para el riñón.

Abreviaturas: CM, células mesangiales; CMLV, células de músculo liso vascular; CEG, células epiteliales glomerulares; CET, células epiteliales tubulares; CEnd, células endoteliales; M $\phi$ , macrófagos; ?, efecto contradictorio.

### 1.1. Mesangio glomerular

El glomérulo es una estructura muy compleja que contiene varios tipos celulares (endoteliales, epiteliales, mesangiales y macrófagos residentes). El mesangio glomerular se encuentra en una posición intercapilar en el glomérulo. Está compuesto de células mesangiales y de su matriz extracelular, que llena el espacio entre las células, presentando canales por donde circula un flujo plasmático de macromoléculas (figura 3).

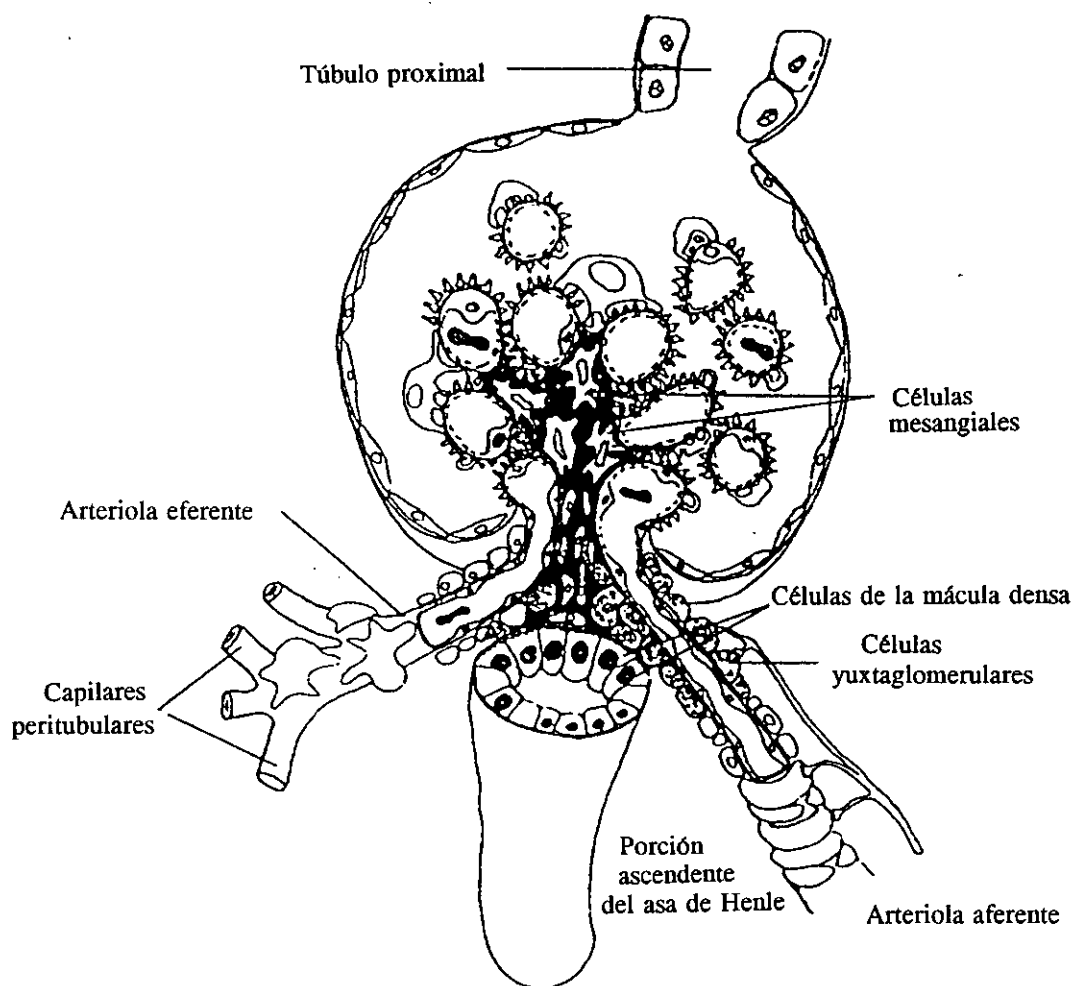


Figura 3. Representación esquemática del glomérulo.

Las células mesangiales juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural en la región axial glomerular. Regulan la hemodinámica glomerular y modifican la tasa de filtración glomerular, mediante cambios en el área disponible para la filtración de solutos. Además, pueden modular el daño glomerular gracias a su capacidad fagocítica, a la generación de diversos mediadores de la inflamación y agentes vasoactivos, al control de su proliferación, y a la capacidad de sintetizar y degradar distintos elementos de la matriz mesangial (revisado en Mené et al., 1989; Kasgharian et al., 1992). En la tabla 2 se describen las funciones más importantes de las células mesangiales, así como algunas citoquinas y factores de crecimiento que pueden regular su comportamiento.

La matriz mesangial desempeña un papel activo en la regulación del comportamiento de las células mesangiales que se encuentran en contacto con ella. Tiene una composición molecular muy compleja, aunque no se conoce todavía bien su organización (revisado en Kasgharian et al., 1992). En situaciones de daño renal, la composición de la matriz mesangial se altera, aumentando los componentes normales (como fibronectina, colágeno tipo IV y proteoglicanos), debido a una mayor síntesis y una disminución de su degradación, y apareciendo proteínas que no se expresan en condiciones normales, como los colágenos intersticiales, tipo I y III.

Tabla 2. Características de las células mesangiales.

1. Regulación de la hemodinámica glomerular	<div> <div>Contracción</div> <div>Relajación</div> </div>	<div> <div>AngII, ET-1, TxA2, PAF, Leucotrieno ICs, Citoquinas, PDGF, Arginina</div> <div>PGE2, PGI2 NO, bradiquininas, ANF</div> </div>
2. Síntesis de agentes vasoactivos		renina PAF, PG
3. Síntesis de mediadores del daño renal	<div> <div>Factores de crecimiento</div> <div>Autacoides</div> <div>Enzimas</div> </div>	<div> <div>TGF-<math>\beta</math>, ET-1, PDGF, EGF, IL-1, 6, 8 bFGF, MCP-1, GM-CSF, CSF-1, IGF</div> <div>Eicosanoides, PAF, NO, metabolitos de oxígeno</div> <div>Colagenasa, renina, gelatinasa, 5' nucleotidasa activadores/inhibidores del plasminógeno</div> </div>
4. Factores que afectan la proliferación	<div> <div>Activadores</div> <div>Inhibidores</div> </div>	<div> <div>ET-1, TxA2, PAF, TNF, Interleuquinas, TGF-<math>\beta</math> (dosis bajas), EGF, IGF</div> <div>NO, prostaglandinas, bradiquininas TGF-<math>\beta</math> (altas dosis)</div> </div>
5. Componentes de matriz		FN, LM, Col I, III, IV, VyVIII, trombospondina condroitin/dermatan sulfato, nidogeno, entactina
6. Factores que regulan la síntesis de la matriz mesangial	<div> <div>Activadores</div> <div>Inhibidores</div> </div>	<div> <div>TGF-<math>\beta</math>, TxA2, PAF, Interleuquinas, ET-1, EGF, IGF, TNF</div> <div>NO, bradiquininas</div> </div>

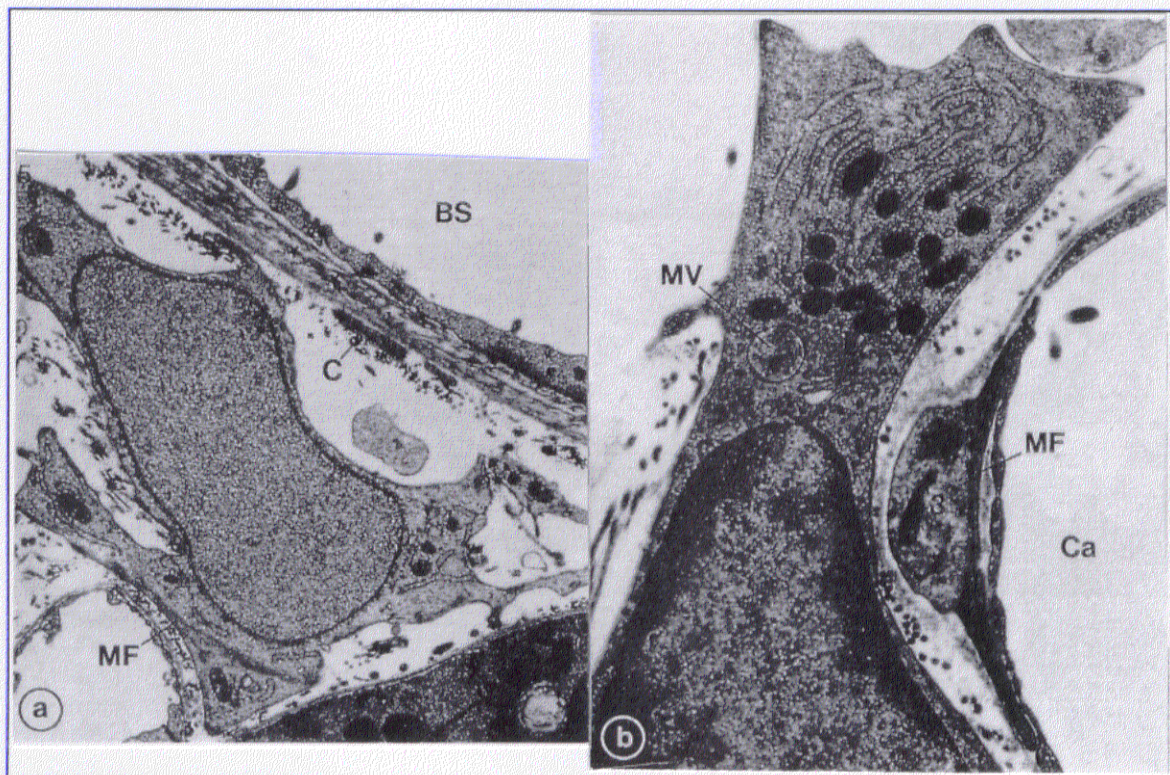


## 1.2. Fibroblastos en el daño renal.

La fibrosis renal se caracteriza por un aumento en la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular, como colágenos tipo I y III, fibronectina y proteoglicanos, siendo el fibroblasto intersticial la principal célula efectora de este proceso (revisado en Strutz, 1995).

Historicamente las células intersticiales se han clasificado en tres grupos. El primero lo forman las células tipo-fibroblasto de la corteza y de la médula externa y las células cargadas de lípidos de la médula interna. Los macrófagos y los pericitos forman los otros dos grupos. Las células tipo-fibroblasto poseen características típicas de fibroblastos, como morfología fusiforme, prominente retículo endoplasmico rugoso y aparato de Golgi, así como abundante mitocondria y se distinguen de los macrófagos mediante microscopía electrónica (Komuro et al., 1990) (figura 4).

Bajo condiciones fisiológicas sólo una pequeña proporción de las células intersticiales participan en la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular. Wiggins y cols., han demostrado que en riñón de conejo sano, las células intersticiales no producen colágeno tipo I (Wiggins et al., 1993). Sin embargo, en condiciones patológicas las células intersticiales proliferan y se expanden hacia el parénquima que les rodea. Además, los fibroblastos se activan y sintetizan proteínas de matriz y factores de crecimiento, desarrollando características de células de músculo liso al expresar  $\alpha$ -actina (revisado en Strutz, 1995).



**Figura 4.** *Fibroblasto intersticial.* Microscopía electrónica. (B) Ampliación. Nota: MF, microfilamentos; BS, espacio de Bowman; C, fibras de colágeno; MV, multivesículas; Ca, capilar; 3, célula perivascular. Tomado de Lemley et al., 1991.



### 1.3. Células infiltrantes en el daño renal

Una de las hipótesis sobre la progresión del daño renal atribuye a las células inflamatorias un papel importante en este proceso, al liberar citoquinas y factores de crecimiento que contribuyen a la perpetuación del daño.

En el glomérulo normal existe una pequeña población de macrófagos con función desconocida. Las nefritis humanas se caracterizan por presentar un acúmulo de macrófagos en el área glomerular e intersticial. El reclutamiento celular se produce por la liberación de sustancias quimiotácticas o activadoras por parte de las células residentes, que inducen la expresión de moléculas de adhesión facilitando la migración de los monocitos desde los vasos sanguíneos al mesangio.

Una gran variedad de factores se han implicado en el reclutamiento de macrófagos hacia el glomérulo (tabla 3), entre los que cabe destacar la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1). Las células mesangiales producen MCP-1 en respuesta a diversos factores implicados en el daño renal como citoquinas (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ), factores de crecimiento como PDGF, LPS, inmunocomplejos de IgG y lípidos como el PAF (Satriano et al., 1993; Gómez-Chiarri et al., 1993), aunque se desconoce si péptidos vasoactivos como la AngII son capaces de producirlo. En algunas nefropatías se ha demostrado un aumento en la expresión renal del gen del MCP-1 aunque no se sabe cuales son las células responsables de su síntesis *in vivo* (Scholdorff et al., 1995).

Las células circulantes tienen receptores para la AngII (Shimada et al., 1978) y para su producto de degradación la AngIII (Sasaki et al., 1991). Recientemente se ha demostrado que ambas sustancias son quimiotácticas para células mononucleares humanas (Yamamoto et al., 1993 a), pero el papel de la AngII en los procesos de inflamación y en las respuestas inmunes se desconoce.

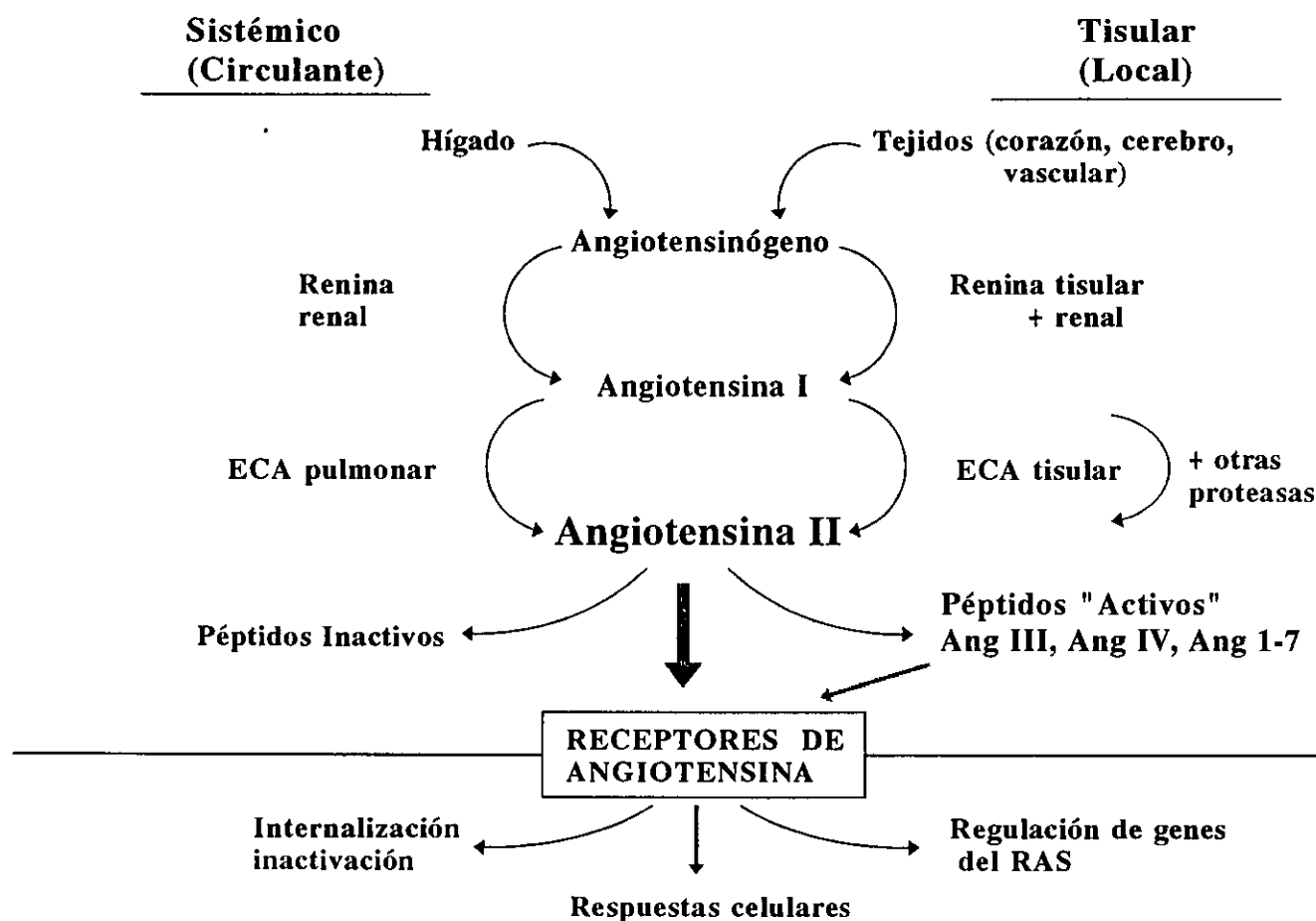
**Tabla 3.** Algunos factores implicados en el reclutamiento celular a nivel renal

Sustancia	Fuente celular	Estímulo	Función
TGF- $\beta$	M $\phi$ Células residentes	AngII, AIGG, LDL, TxA <sub>2</sub>	Quimiotáctico para fibroblastos
IL-1 $\beta$	M $\phi$ , CM	LPS, AIGG	Síntesis de MCP-1, IL-8, CSF-1
TNF- $\alpha$	M $\phi$ , CM	LPS, IL-1 $\beta$ , AIGG, TNF- $\alpha$	Síntesis de MCP-1, IL-8, CSF-1
IL-8	CMH, CET	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS	Quimiotáctico para neutrófilos
IP-10	Expresado por CM, CEG	IFN- $\gamma$ , LPS, AIGG, TNF- $\alpha$	Desconocida
Rantes	epitelio tubular	TNF- $\alpha$	Quimiotáctico
MCP-1	CM, M $\phi$	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , AIGG	Quimiotáctico para monocitos
CyB	CM, CET, Fibroblastos	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , AIGG, Ciclosporina	Quimiotáctico para linfocitos y monocitos
PAF	CM, CEG	TNF- $\alpha$ , AngII	Quimiotáctico para neutrófilos y monocitos

Abreviaturas: CM, células mesangiales; CEG, células epiteliales glomerulares; CET, células epiteliales tubulares; M $\phi$ , macrófagos.

## 2. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (RAS)

En 1898, Tigerstedt descubrió que un extracto renal contenía una sustancia vasopresora a la que denominó "renina". En 1940, dos grupos, uno dirigido por Page & Helmer en los Estados Unidos y otro por Brann-Menendez en Argentina, demostraron que la renina actuaba sobre un sustrato del plasma (el angiotensinógeno) produciendo una sustancia con propiedades presoras, a la que denominaron "angiotensina". En la década de los 50, Skeggs y cols. determinaron la estructura de la angiotensina y descubrieron que el decapeptido angiotensina I (AngI) se convertía en el octapéptido angiotensina II (AngII) por la acción de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) (figura 5) (revisado en Waeber et al., 1984).



**Figura 5.** Componentes del sistema renina angiotensina.

El RAS está compuesto de un grupo de proteínas y péptidos que interactúan en forma de cascada. La renina actúa sobre el angiotensinógeno (Ao) dando lugar al decapeptido NH<sub>2</sub>-terminal angiotensina I (AngI), sobre el que actúa la ECA liberando el dipéptido His-Leu COOH-terminal y origina el péptido activo AngII. Se señala el origen de estas sustancias en la circulación; la renina es secretada desde el riñón, el Ao desde el hígado y la ECA proviene principalmente del endotelio capilar del pulmón.

Durante mucho tiempo se ha considerado al sistema renina angiotensina (RAS) como un sistema humoral clásico implicado en los procesos de control del volumen intravascular y de la regulación de la presión sanguínea. Datos recientes también sugieren que funciona a nivel paracrino-autocrino (revisado en Dzau et al., 1988; Mulrow et al., 1993). Los componentes del RAS están presentes en muchos tejidos, como corazón, pared vascular, riñón, glándula adrenal y cerebro, y existen evidencias de la síntesis local de AngII a esos niveles (Griedling et al., 1993).

Uno de los primeros efectos descritos de la AngII fue su capacidad para regular la secreción de aldosterona (Gross et al., 1968). Actualmente se conoce que la AngII presenta una gran diversidad de respuestas fisiológicas, participando en la regulación de las funciones cardiovasculares, renales y endocrinas. En los últimos años se ha planteado la hipótesis de que la AngII puede actuar como un factor de crecimiento renal participando en los procesos de crecimiento celular asociados con la progresión de la enfermedad renal (revisado en Wolf, 1993a).

## 2.1. Renina

La renina es una glicoproteína con actividad aspartil proteasa muy específica de su sustrato, el angiotensinógeno, sobre el que actúa rompiendo un enlace Leucina-Valina. La renina activa se produce en grandes cantidades en el aparato yuxtaglomerular del riñón, y es la responsable de la cascada renina-angiotensina-aldosterona que produce la mayoría de la AngII del RAS circulante (Burns et al., 1993). Sin embargo, existen múltiples sitios extrarenales que expresan mRNA de la renina, como el sistema vascular, la glándula adrenal y el cerebro.

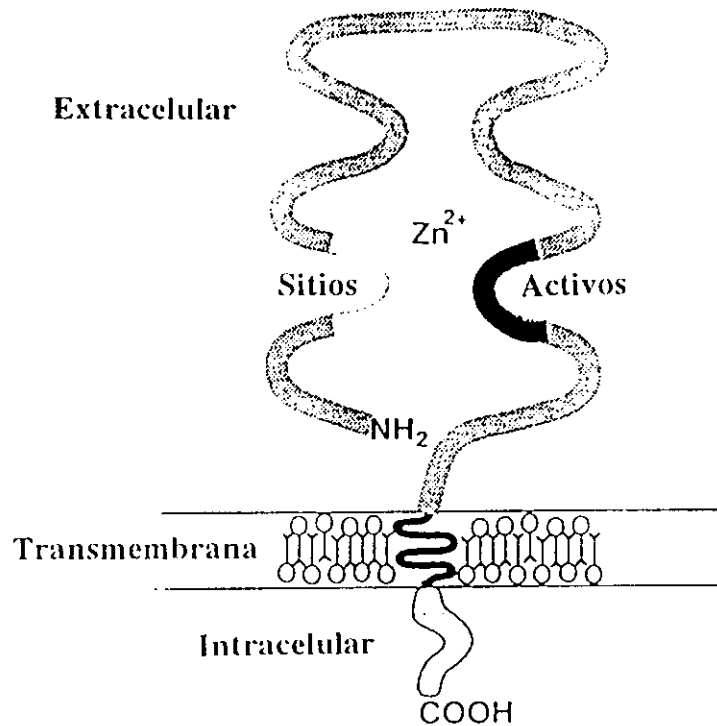
## 2.2. Angiotensinógeno (Ao)

El Ao es una glicoproteína de 56-60 KDa producida en el hígado y liberada a la circulación. Su síntesis está regulada por mecanismos a largo plazo, se estimula por glucocorticoides, hormona tiroidea y AngII. Los niveles de Ao aumentan durante las infecciones y el daño tisular (Hoj et al., 1987). El promotor del gen del Ao contiene elementos de respuesta a proteínas de fase aguda (Ron et al., 1990). La administración de lipopolisacárido da lugar a un aumento en la expresión hepática del mRNA del Ao (Kageyama et al., 1985), así como en sus niveles plasmáticos (Okamoto et al., 1987). La expresión del mRNA del Ao se ha demostrado en distintos tejidos, incluido el riñón estando regulada de manera diferente, dependiendo de la abundancia de distintos factores de transcripción (Brasier et al., 1994).

## 2.3. Enzima de conversión de la angiotensina (ECA)

La ECA o quininasa II (EC 3.4.15.1) es una dipeptidilcarboxipeptidasa (Ehlers et al., 1989), con características de zinc-metaloenzima con una sola cadena polipeptídica (figura 6). Es una enzima que separa dipéptidos del extremo carboxilo terminal de diversos polipéptidos (bradiquinina, sustancia P, neurotensina y otros) aunque es bastante selectiva *in vivo* al estar regulada por varios factores, como afinidad, concentración de sustratos y dependencia de cloro. La ECA puede actuar sobre la [des-

Aps<sup>1</sup>]AngI produciendo AngIII. Juega un papel muy importante en la regulación del RAS y del sistema calicrenina-quinina, al convertir la AngI en AngII e inactivar la bradiquinina (revisado en Gunning et al., 1994).



**Figura 6.** Representación esquemática de la ECA. Se muestra la distribución de los dominios citoplasmático, transmembrana y extracelular, que contiene dos sitios activos dependientes de zinc.

La ECA está ampliamente distribuida y se encuentra en altas concentraciones en el riñón, corazón, vasos sanguíneos, macrófagos, cerebro y testículos (Jonhston et al., 1992). Está presente como una ectoenzima en las células del endotelio vascular y en el borde en cepillo de las células epiteliales tubulares (Ikemoto et al., 1987), así como en otras células, donde está unida a la membrana con el sitio activo dirigido hacia el exterior celular. La mayor parte de la ECA del suero proviene del endotelio vascular pulmonar, así como de la producción por macrófagos. Se ha demostrado que existen dos mRNA de diferente tamaño en pulmón (4150 bp) y en riñón (4900 bp), que producen dos isoenzimas transcritas de un mismo gen por distintos promotores (Sibony et al., 1993).

En diversas enfermedades, como en la sarcoidosis, existe un aumento de la ECA en suero, producida por macrófagos y células del granuloma epiteloide (Studdy et al., 1986; Friedland et al., 1978). Por otra parte, existe muy poca información acerca de la ECA circulante en modelos crónicos de daño renal. Se sabe que la actividad de la ECA está aumentada en el modelo de nefrosis por puromicina (Anderson et al., 1990) y en el 60% de los pacientes crónicos de hemodiálisis (Patel et al., 1979). En células endoteliales, un aumento en la actividad de la ECA puede ser inducida por

glucocorticoides, ET-1, factor de crecimiento fibroblástico y por la inhibición crónica de la ECA (King et al., 1992; Schunkert et al., 1993; Fishel et al., 1995). Existe una activación de la ECA vascular en respuesta al daño endotelial por balón, produciendo un aumento en la concentración de AngII local (Rakugi et al., 1994). Además, experimentos de transfección han demostrado que la superexpresión de la ECA dentro de la pared vascular causa hipertrofia vascular independientemente de factores sistémicos y hemodinámicos (Morishita et al., 1994).

## 2.4. Angiotensinasas

Además de la ECA otras peptidasas pueden producir AngI y AngII a partir del Ao. Entre ellas cabe destacar las quimasas aunque su importancia fisiológica se desconoce. También existen angiotensinasas inespecíficas que hidrolizan la AngII y AngIII a compuestos biológicamente inactivos (Ledingham et al., 1974). La aminopeptidasa A elimina la región NH<sub>2</sub>-terminal de la AngI y AngII, formando [des-Aps<sup>1</sup>]AngI y AngIII (revisado en Gunning et al., 1994). En un modelo de nefritis membranosa se ha demostrado un aumento en la expresión renal del mRNA de la aminopeptidasa A, que disminuye en respuesta al tratamiento con enalapril, sugiriendo que la AngII regula de modo directo su expresión renal (Wetzels et al., 1995).

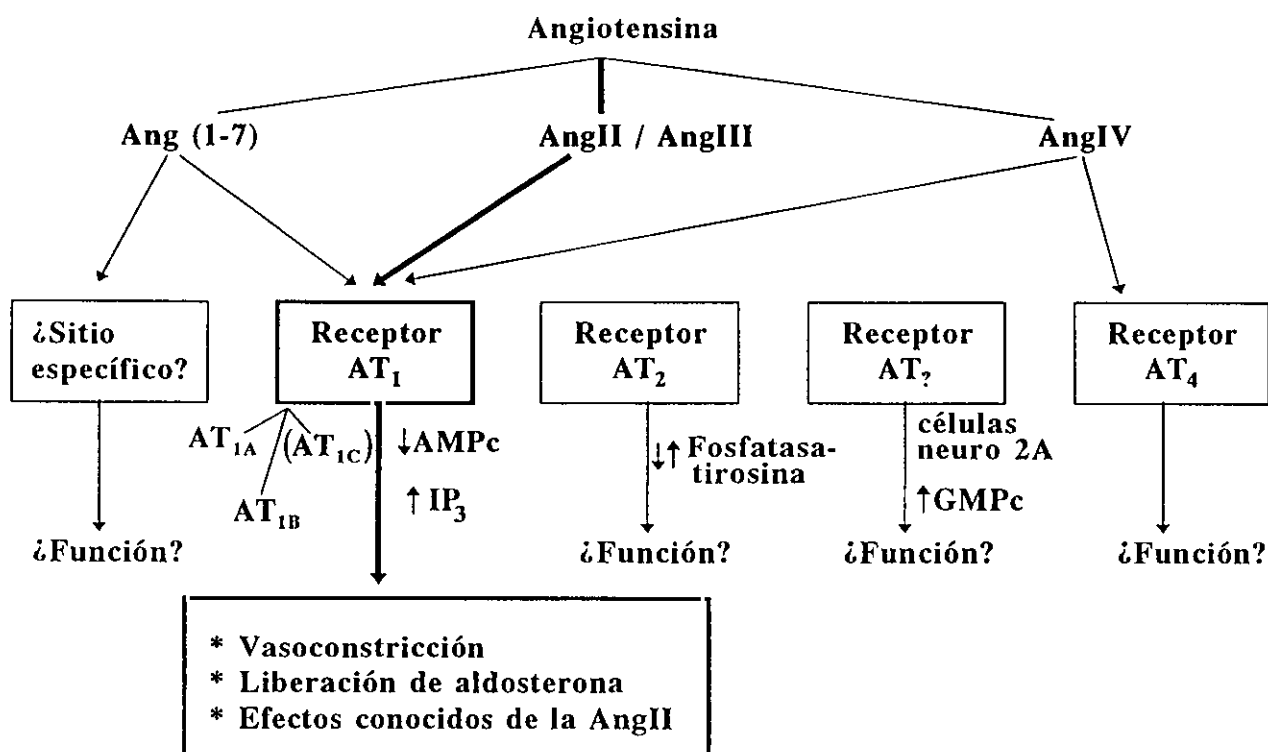
## 2.5. Péptidos de degradación de la angiotensina

La AngII tiene una vida media biológica relativamente corta, ya que es metabolizada rápidamente por varias peptidasas. La mayoría de los metabolitos de la AngII son inactivos, pero existen algunos como la AngIII y la AngIV con actividad biológica.

La AngIII o des[Asp<sup>1</sup>]AngII es un heptapéptido que regula la presión sanguínea al promover la contracción de las células musculares (Johnson et al., 1990). También se ha descrito que tiene propiedades quimiotácticas para leucocitos (Yamamoto et al., 1993), y en fibroblastos cardíacos aumenta la expresión de algunos genes, como el TGF- $\beta$  y el angiotensinógeno (Cabros et al., 1994).

## 2.6. Receptores de angiotensina

Existen receptores específicos de AngII en la membrana plasmática celular y también se han descrito receptores citosólicos y nucleares (revisado en Gunning et al., 1994). Mediante agentes farmacológicos se ha demostrado la heterogeneidad de los receptores de AngII. Existen al menos dos grandes subtipos, denominados AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, que se diferencian por su unión a antagonistas, susceptibilidad a agentes reductores y segundos mensajeros. La distribución de los subtipos varía en función de los tejidos, de las etapas de desarrollo y de la especie. La mayor parte de los efectos fisiológicos de la AngII están mediados por el receptor AT<sub>1</sub> (figura 7), mientras que el receptor AT<sub>2</sub> parece tener propiedades antiproliferativas (Stoll et al., 1995).



**Figura 7.** Subtipos de receptores de Angiotensina. Actualmente se defiende el concepto de que el receptor  $AT_1$  es el efector de los péptidos de la angiotensina.

### 2.6.1. Receptor $AT_1$ .

El receptor  $AT_1$  es un miembro de la familia de receptores con siete dominios transmembrana, activados por un monómero acoplado a proteínas G, que presentan la región amino terminal hacia el exterior de la membrana plasmática (Strosberg et al., 1991), similar al de la bradiquinina, la vasopresina y la sustancia adrenérgica, entre otros. El receptor  $AT_1$  tiene cuatro cisteínas extracelulares que forman puentes disulfuro (sensibles a agentes reductores). Presenta un Aspártico crítico, Asp<sup>74</sup>, para la unión y los mecanismos de transducción de señal de la AngII (Bihoreau et al., 1993). Estudios de mutagénesis dirigida han mostrado que al cambiarlo por una Asparagina pierde su capacidad de unión y por un Glutámico pierde la capacidad de estimular la hidrólisis de inositol fosfato o de movilizar calcio.

Los receptores  $AT_1$  han sido clonados en varias especies. En la rata, existen dos subtipos, el  $AT_{1A}$  y el  $AT_{1B}$ , que muestran una gran variabilidad en su expresión tisular. Poseen una homología del 90% en su secuencia. Ambos están acoplados a proteínas G y activan la fosfolipasa C. Se diferencian en un residuo de cisteína en la región amino terminal, que podría sufrir una modificación postranscripcional asociada a un cambio funcional, y dos serinas, sitios posibles de fosforilación por proteína quinasa C (Griedling et al., 1993).

La interacción de la AngII con su receptor en la membrana celular se regula a tres niveles (Douglas et al., 1987). Primero, la afinidad de la unión ligando receptor está modulada por mecanismos iónicos ( $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ) y moleculares (GTP), regulando las respuestas celulares a corto plazo. Segundo, la célula puede regular la expresión del gen del receptor alterando su número en la superficie celular y la función celular a largo plazo. Tercero, los receptores pueden sufrir un proceso de internalización y reciclado. La AngII induce una retroinhibición de su receptor a dos niveles, produciendo internalización (Griendling et al., 1987) y reduciendo los niveles del mRNA (Makita et al., 1992). Los receptores de AngII están regulados por una variedad de hormonas independientes de cambios en el RAS, entre las que se incluyen esteroides y péptidos como insulina y prolactina (revisado en Douglas et al., 1987).

### 2.6.2. Mecanismos de actuación intracelular del receptor $AT_1$ .

La mayor parte de los estudios han sido realizados en células de músculo liso vascular. Cuando la AngII se une al receptor  $AT_1$ , presente en la superficie celular, provoca un cambio conformacional, que da lugar a la activación de diversas fosfolipasas. La fosfolipasa C (PLC), se activa vía proteínas G, generando dos segundos mensajeros, el inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y el diacilglicerol (DG). Seguidamente, el  $IP_3$  produce la liberación de  $Ca^{2+}$  de los depósitos intracelulares. El DG y el  $Ca^{2+}$  estimulan proteínas quinasas intracelulares, en particular la proteína quinasa C (PKC) (figura 8). La PKC participa en diversos fenómenos, como la contracción de los vasos, la inducción de determinados genes, como c-fos y TGF- $\beta$  (Gibbons et al., 1992), provoca la fosforilación de PLC- $\gamma$ 1 que actúa disminuyendo la actividad de la PLC, proceso mediante el cual se limitan y terminan los efectos de la AngII. La fosfolipasa A2 (PLA $_2$ ) aumenta la producción de ácido araquidónico, con la consecuente liberación de prostanglandinas.

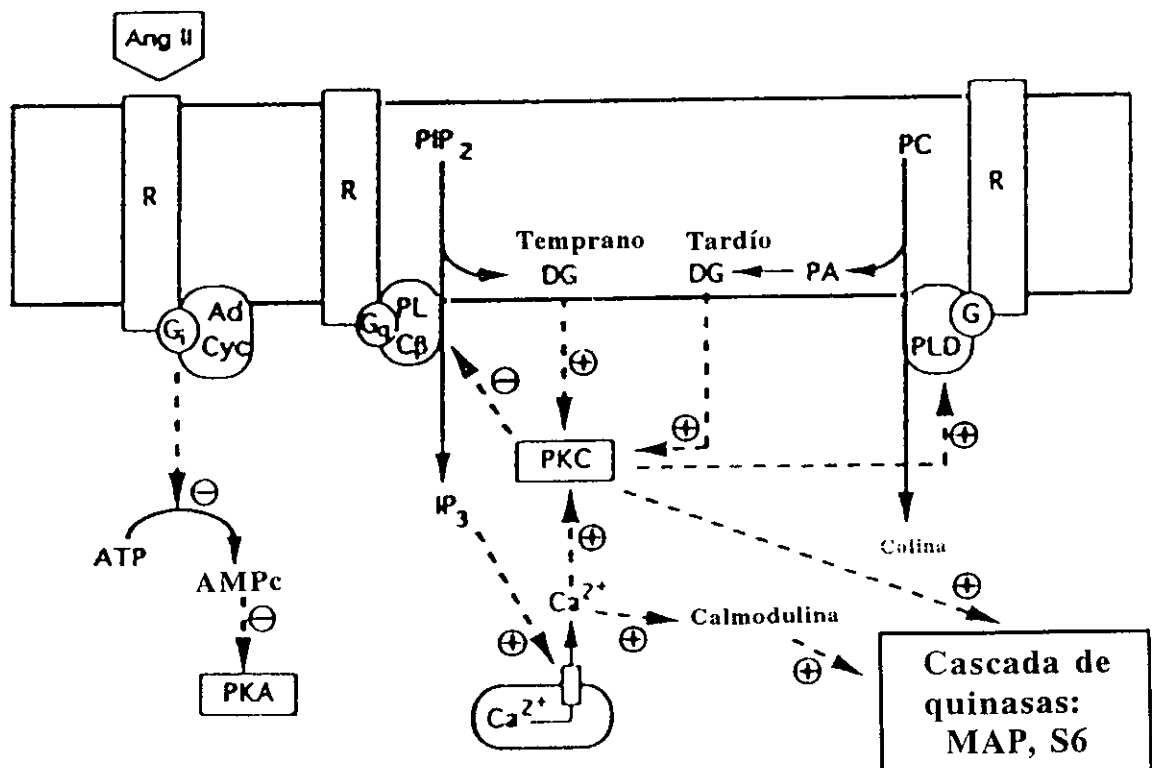


Figura 8. Mecanismos de actuación intracelular de la AngII.

Todos estos fenómenos intracelulares son críticos en la respuesta específica de la activación del receptor  $AT_1$  en cada tejido. Estas señales intracelulares ocurren en un tiempo muy corto (alrededor de diez minutos) tras la estimulación. La AngII también induce alteraciones en la función celular que requieren un mayor tiempo para manifestarse, como respuestas de crecimiento causadas por la inducción de determinados genes. Por ejemplo, la estimulación durante 1 hora con AngII induce la expresión del proto-oncogen c-fos, requiriéndose varias horas para aumentar la expresión de factores de crecimiento, como TGF- $\beta$ . Estos factores de crecimiento parecen ser importantes en la respuesta hipertrófica y/o proliferativa en diferentes tejidos (Gibbons et al., 1992).

### 3. COMPONENTES DEL RAS EN EL RIÑÓN

En el riñón adulto en condiciones normales, la renina está localizada en las células yuxtaglomerulares, un tipo de células de músculo liso modificadas situadas en la arteriola distal. También existen células que contienen renina en el glomérulo y en la arteriola eferente (Farak et al., 1992).

Mediante hibridación *in situ*, Ingelfinger ha encontrado mRNA de angiotensinógeno localizado principalmente en el túbulo proximal y, en menor proporción, en glomérulos, túbulos distales y vasos intrarenales (Ingelfinger et al., 1990).

Seikaly y cols. han demostrado que la concentración de la AngII en el fluido del túbulo proximal es del orden de nanomoles, mientras que la concentración en la circulación sistémica es mil veces menor, del orden de picomoles, lo que sugiere una producción intrarenal de AngII, localizada en el túbulo proximal (Seikaly et al., 1986).

La ECA está localizada en las células endoteliales glomerulares (Caldwell et al., 1976), en el borde en cepillo del túbulo proximal (Danilov et al., 1987) y, en menor cantidad, en las arteriolas y glomérulos (Ikemoto et al., 1987; Marchetti et al., 1987; Rosenberg et al., 1994).

Mediante autorradiografía se han localizado receptores de AngII en la arteriola aferente y eferente, en las células mesangiales, en el túbulo proximal y en estructuras de la médula que corresponden a las áreas vasculares (Osborne et al., 1973; Sraer et al., 1974). La distribución de estos receptores se correlaciona con los sitios fisiológicos de mayor acción de la AngII. Mediante la técnica de hibridación *in situ* se ha visto que están muy expresados en glomérulos, vasa recta, médula externa y en túbulos. En el riñón fetal humano predomina el receptor  $AT_2$ , mientras que en el adulto el  $AT_1$  es el más abundante.

En la corteza renal existen dos subtipos de receptores  $AT_1$ , con diferentes cinética de unión y mecanismos de transducción de señal en el glomérulo y en el túbulo:

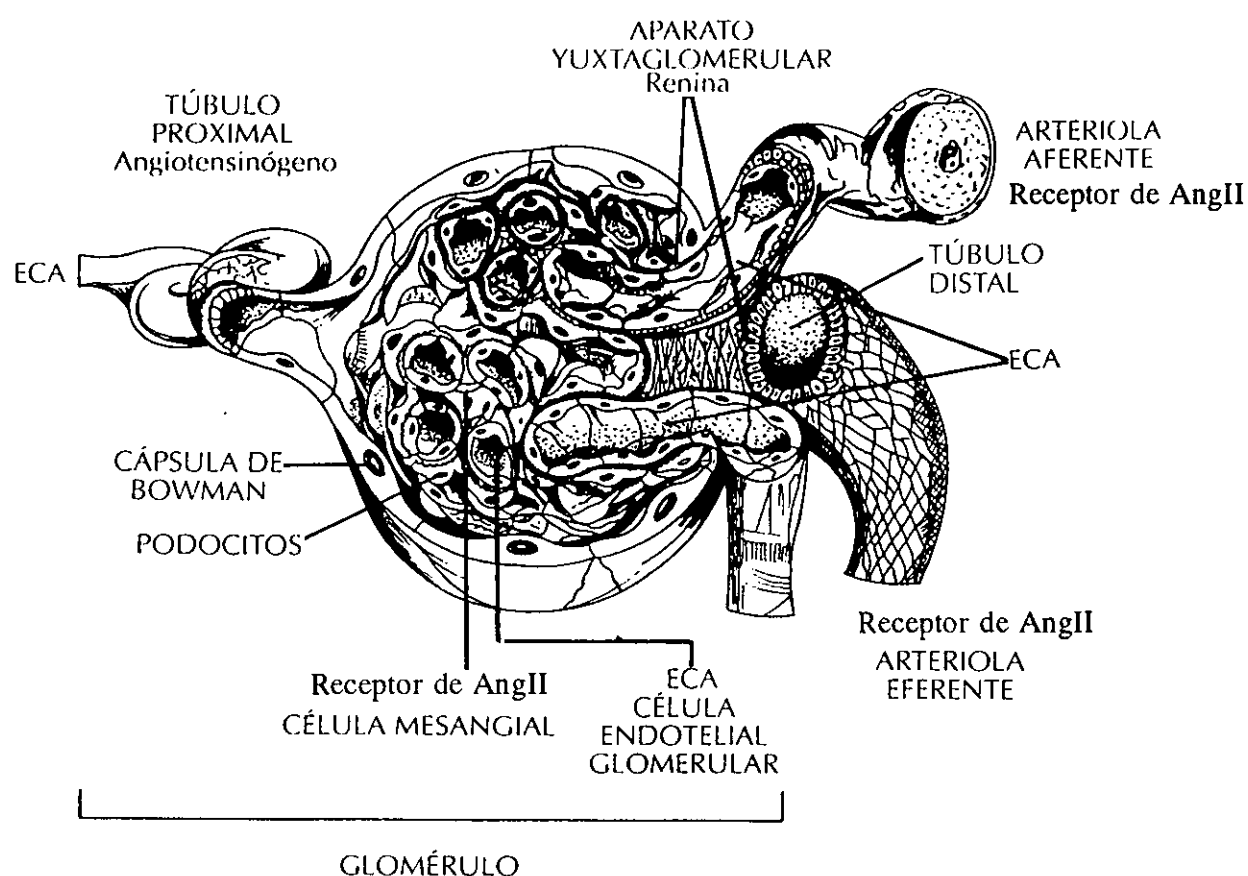
- *El receptor presente en el glomérulo* une AngIII con bastante afinidad, se inhibe su expresión con AngII y está acoplado a proteínas G, liberando calcio intracelular por un mecanismo dependiente de fosfolipasa C. Además actúa disminuyendo el AMPc lo que provoca la inhibición de la adenilato ciclasa.



fosfolipasa C. Además actúa disminuyendo el AMPc lo que provoca la inhibición de la adenilato ciclasa.

- El receptor presente en el túbulo une AngIII con baja afinidad, aumenta su expresión con AngII, provoca una movilización de calcio muy lenta, inhibe la actividad de adenilato ciclasa por una proteína G inhibidora, activa la fosfolipasa A<sub>2</sub> liberando PGE<sub>2</sub> y presenta una respuesta bifásica en sus efectos fisiológicos.

Recientemente se ha demostrado que las células mesangiales poseen receptores AT<sub>4</sub>, que unen AngII (3-8), farmacológicamente distintos de los AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> (Chansel et al., 1995), por lo que los productos de degradación de la AngII podrían actuar controlando las funciones glomerulares.



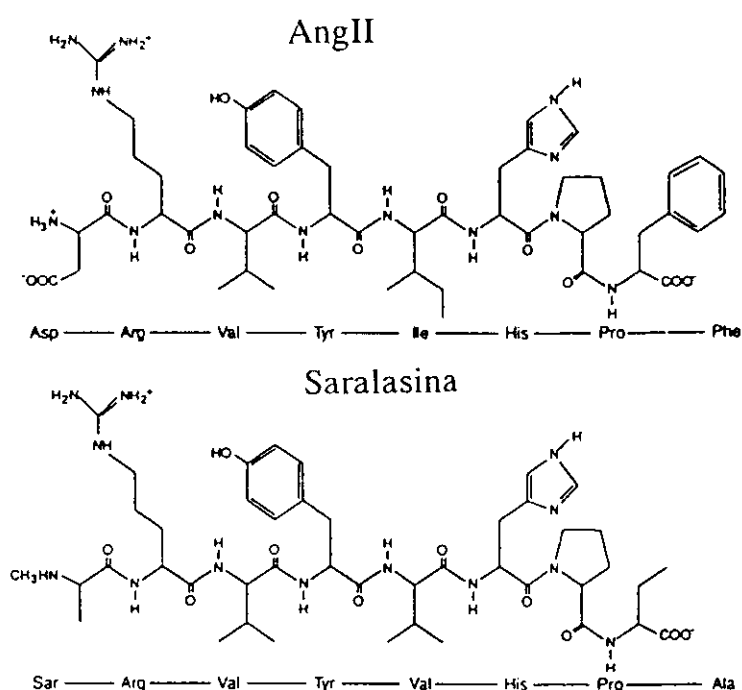
**Figura 9.** Localización de la síntesis de los componentes del RAS intrarrenal.

#### 4. FARMACOLOGIA DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

En 1934, los experimentos realizados por Goldbatt, que demostraban que la constricción de la arteria renal provocaba hipertensión, promovieron un gran interés hacia el estudio del RAS. En 1962 se sugirió que este sistema jugaba un papel activo en la patogenia de algunos tipos de hipertensión en el hombre, lo que condujo al desarrollo de antagonistas de los componentes del RAS para su empleo como agentes terapéuticos en la regulación de la tensión arterial (Weaber et al., 1984).

A pesar de los numerosos estudios realizados, no se han podido correlacionar los niveles de la renina en plasma con los valores de la presión sanguínea en situaciones de hipertensión sistémica o renovascular, debido probablemente a variaciones por la ingesta de sodio o por las funciones del RAS relacionadas con modificaciones en los niveles de aldosterona (Rosenberg et al., 1994).

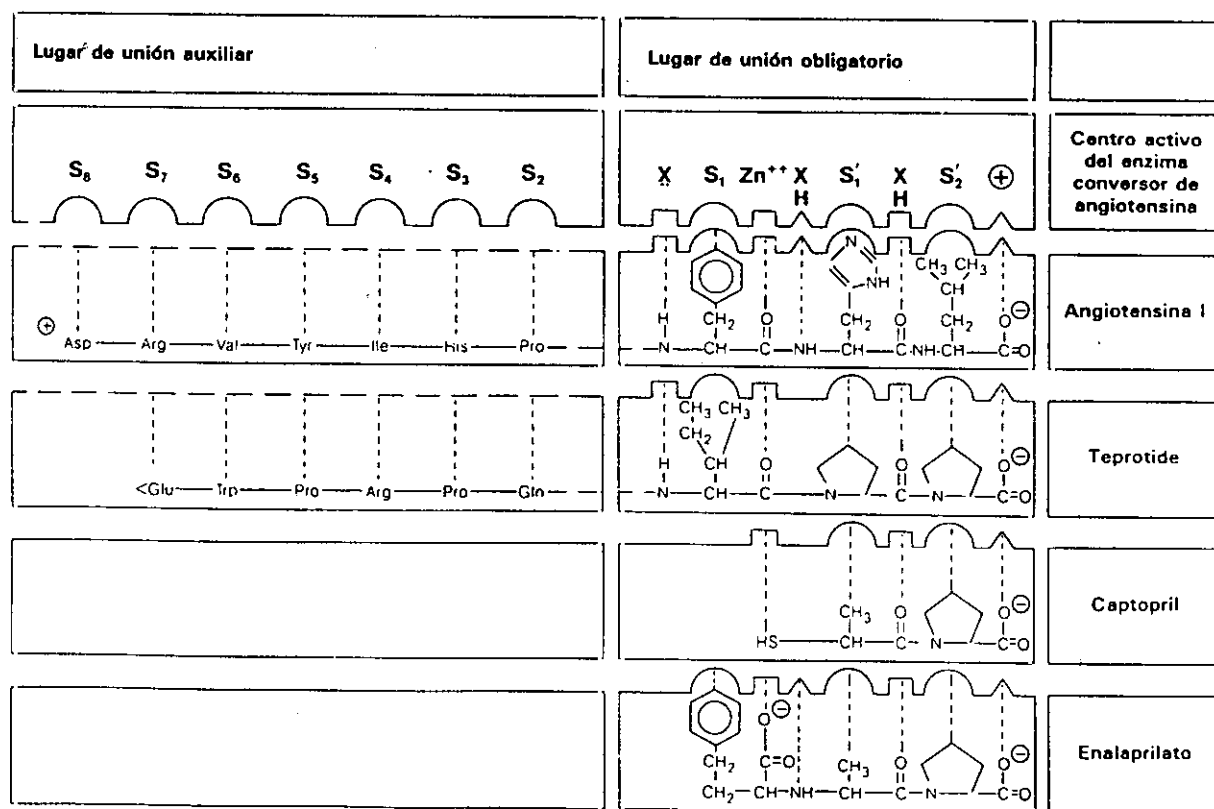
Los primeros intentos de bloquear el RAS se realizaron empleando antagonistas de los receptores de la AngII. El primer antagonista potente fue la saralasina ([Sar<sup>1</sup>,Ala<sup>8</sup>]AngII) (Brunner et al., 1973) (figura 10) que demostró disminuir la tensión arterial elevada en humanos, pero su empleo se vio limitado a causa de su naturaleza peptídica que hacía necesaria la administración por vía intravenosa y a sus efectos secundarios en algunos pacientes (Streeten et al., 1975).



**Figura 10.** Estructura química de la AngII y saralasina. Obsérvese que la saralasina es un análogo de la AngII con sustituciones en las posiciones 1,6 y 8.

En 1965 se demostró la existencia de un factor potenciador de bradiquinina en el veneno de una serpiente sudamericana, la *Bothrops jararaca*, de donde se aisló el teprotide, primer análogo de la molécula natural de la AngII (Ondetti et al., 1981). Un equipo de investigadores de Squibb dirigido por Ondetti y Cushman, mediante la utilización de la cristalografía de rayos X, estudiaron su estructura tridimensional y fueron capaces de sintetizar un inhibidor de la ECA (iECA) activo por vía oral, el captopril (Ondetti et al., 1977). En 1975, Patchett y su grupo de colaboradores de los laboratorios Merck comenzaron a trabajar en diseños de estos fármacos desarrollando una molécula con mayor grado de unión y sin el grupo sulfhidrilo: el enalapril (figura 11) (Patchett et al., 1980). En la actualidad los iECA se emplean en el tratamiento de la hipertensión, la insuficiencia cardíaca y algunas enfermedades renales. Estudios experimentales sugieren que pueden ser efectivos en la reducción de la progresión del daño renal.

En la década de 1980, diversos grupos demostraron la heterogeneidad de los subtipos de receptores de AngII basados en estudios farmacológicos, bioquímicos y fisiológicos (revisado en Timmermans et al., 1992; Smith et al., 1992). En 1982, Furakawa describió una serie de benzil-derivados de imidazoles que antagonizaban la vasoconstricción de la AngII. Estos imidazoles sirvieron para el diseño de fármacos que dieron lugar a antagonistas específicos de los receptores de la AngII, el DUP753 (diseñado por Timmermans, Dupont) y el PD123177 (Warner Lambert, Parke Davis) (figura 12). Estos compuestos han establecido la existencia de al menos dos subtipos de receptores, el AT<sub>1</sub> (bloqueado por DUP753) y el AT<sub>2</sub> (bloqueado por PD123177). El DUP753 (comercializado como Losartan), se emplea en pacientes como un importante agente terapéutico en el control de la hipertensión.

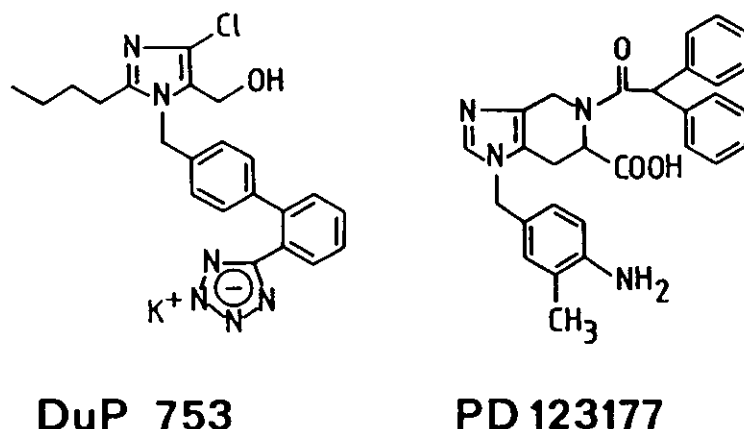


**Figura 11.** Comparación de la unión hipotética del sustrato (AngI) y los inhibidores (teprotide, captopril, enalapril) al centro activo de la ECA.

Obsérvese el grupo sulfidrido de la molécula de captopril. El enalapril se esterifica (maleato), lo que hace que la molécula se absorba fácilmente, se activa al desesterificarse en el intestino, pasando a las formas biológicamente activas de enalaprilato.

Adaptado de Cushman 1982.

Actualmente nos encontramos en un campo de investigación muy activo, donde se van diseñando nuevos fármacos, bien con mayor capacidad de inhibición de la ECA tisular, como el quinapril (Johnston et al., 1992; Warworth et al., 1991), o con diferente vía de eliminación como el fosinipril. Además, se están desarrollando fármacos que antagonizan a los receptores de sustancias relacionadas con el RAS, como las bradiquininas, la endotelina o inhibidores del óxido nítrico. Todas estas herramientas, junto con el empleo de técnicas de biología molecular, permitirán profundizar en el estudio de los mecanismos de daño renal conduciendo a nuevos abordajes terapéuticos.



**Figura 12.** Estructuras químicas de los antagonistas del receptor de la AngII. DUP753, 2-n-butil-4-cloro-5-hidroximetil-1-[(2'-((1H-tetrazol-5-yl)bifenil-4-yl)metil]imidazol, y PD123177, ácido 1-(4-amino-3-metil-fenil)metil-5difenil-acetil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]piridina-6-carboxílico.

## 5. PARTICIPACION DEL RAS EN EL DAÑO RENAL

En 1836 Bright postuló que existía una relación entre la enfermedad renal y la hipertensión, aunque se ha tardado más de un siglo en demostrar que el RAS participa de modo directo en la patogenia del daño renal. En 1985 Anderson y cols. demostraron por primera vez que los iECA reducen la proteinuria y la glomeruloesclerosis en un modelo de nefropatía progresiva en ratas. En 1994 Arai y cols, mediante estudios de transfección *in vivo* de los genes de la renina y de la ECA en riñón de ratas, han demostrado que la superexpresión de los genes del RAS da lugar a la expansión de la matriz mesangial, induciendo a las células glomerulares a producir colágenos intersticiales.

El efecto beneficioso del tratamiento con iECA ha sido demostrado en diversos modelos experimentales animales (revisado en Brunner, 1992). El modelo más estudiado es el de masa renal reducida, caracterizado por proteinuria, hipertensión e insuficiencia renal progresiva asociada a glomeruloesclerosis. También se ha demostrado su eficacia en otros modelos de daño renal, como la nefrectomía unilateral en ratas espontáneamente hipertensas, la hipertensión de Goldblatt, el modelo de nefrosis crónica por puromicina y la nefritis de Heymann. Por el contrario, apenas existen estudios en nefritis de origen inmune. Estudios recientes han mostrado que los iECA disminuyen la proteinuria incluso en sujetos normotensos siendo este efecto independiente del descenso en la presión arterial sistólica (Mimran et al., 1990; Brunner, 1992; Praga et al., 1992; Lewis et al., 1993).

A pesar de los numerosos estudios sobre el tema, el mecanismo del efecto antiproteinurico de los iECA no está completamente esclarecido (tabla 4). Algunos investigadores han propuesto que influyen beneficiosamente en la hemodinámica glomerular (Anderson et al., 1986; Meyer et al., 1987; Savage et al., 1991; Brunner, 1992), debido a su efecto en la reducción selectiva de la resistencia de la arteriola eferente, disminuyendo por tanto la hipertensión glomerular. Otros investigadores han propuesto que podría tener un efecto primario sobre la permeabilidad de la membrana basal glomerular, reduciendo las dimensiones medias de los poros de tamaño grande (Morelli et al., 1990; Remuzzi et al., 1991; Remuzzi et al., 1993a; Mayer et al., 1993). Aunque los mecanismos de este efecto no están aclarados, es posible que la inhibición de la contracción de las células mesangiales inducida por la AngII pudiera evitar los cambios conformacionales en dichas células y, por tanto, la modificación del tamaño de los poros del filtro capilar glomerular. Este fenómeno podría ser independiente de los cambios hemodinámicos y explicar la reducción de la proteinuria.

Otro posible mecanismo se ha atribuido al bloqueo de la actividad de la AngII, inhibiendo su efecto directo en la proliferación celular y en la inducción de genes relacionados con el aumento de matriz extracelular.

Además de disminuir directamente la generación de la AngII, los iECA inducen un aumento en los niveles de la bradiquinina. Estudios recientes sugieren que la bradiquinina tiene efecto antiproliferativo y vasodilatador, al actuar activando la síntesis de óxido nítrico a través de la vía de la L-Arginina. Se ha sugerido que la regulación del RAS, el sistema de las quininas y el óxido nítrico en el riñón está interrelacionada al activar un inhibidor de la óxido nítrico sintasa la expresión del angiotensinógeno y de la calicrenina. Por tanto otro posible mecanismo del efecto beneficioso de los iECA puede ser debido a la formación de bradiquininas, óxido nítrico y prostaciclina.

**Tabla 4.** Posibles mecanismos de actuación de los iECA

1. Control de la hipertensión glomerular
Reducción de la resistencia arteriolar
2. No hemodinámicos
Selectividad de la permeabilidad glomerular
3. Bloqueo de los efectos directos de la AngII
4. Efectos de bradiquininas, óxido nítrico y prostanglandinas

## 6. ANGII Y RIÑÓN

La AngII actúa en el riñón a tres niveles. A nivel de fisiología del órgano (tabla 5), controla la presión sanguínea y actúa como un vasoconstrictor. A nivel de la bioquímica celular, regula la función celular, entre otros fenómenos actúa como un mensajero extracelular al promover la liberación de calcio lo que origina vasoconstricción. A nivel del control de la expresión génica, está relacionada con procesos asociados al crecimiento celular.

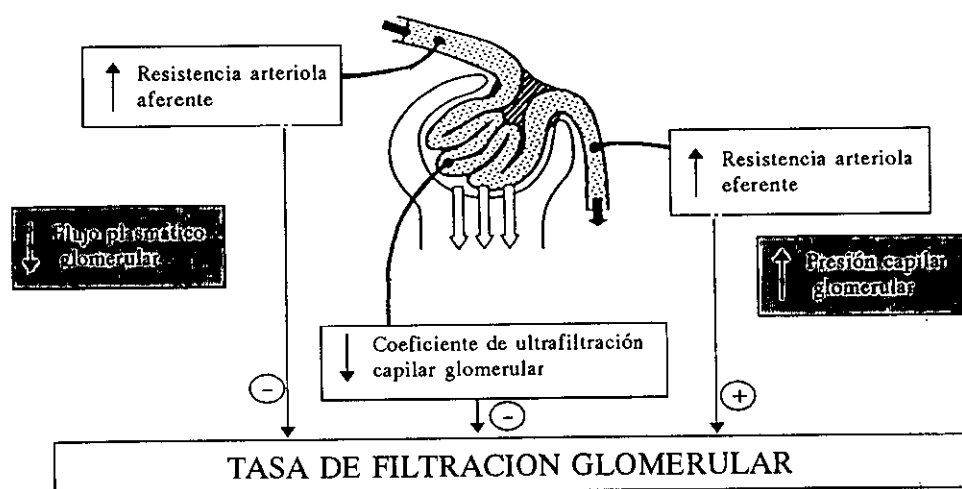
**Tabla 5. Efectos de la AngII en la función renal**

- Modulación del flujo sanguíneo renal
- Aumento de la reabsorción de sodio y agua en el túbulo proximal
- Aumento de la transmisión renal simpática
- Disminución de la liberación de renina
- Procesamiento de macromoléculas

### 6.1. Mecanismos hemodinámicos

La AngII provoca vasoconstricción de la arteriola aferente y eferente, aumentando la presión intraglomerular, que se acompaña con un descenso del coeficiente de ultrafiltración (figura 13) (Ichikawa et al., 1991).

Otro mecanismo mediante el cual la AngII interviene en la hemodinámica glomerular es a través de su acción sobre las células del mesangio. Las células mesangiales están en contacto con las arteriolas aferente y eferente, y con el aparato yuxtaglomerular. La contracción-relajación de estas células puede modular la hemodinámica intraglomerular y el flujo a través del mesangio. La AngII provoca la contracción del mesangio, lo que da lugar a la reducción del área de la superficie glomerular y del coeficiente de ultrafiltración (Ichikawa et al., 1991).



**Figura 13. Efecto de la AngII sobre la microcirculación glomerular.** Tomado de Ichikawa, 1991.

## 6.2. Mecanismos de actuación intracelular de la AngII en células mesangiales

La mayor parte de los efectos de la AngII en las células mesangiales se producen a través de la unión al receptor  $AT_1$ . Como hemos comentado en el apartado 2.6.2, la AngII al unirse al receptor  $AT_1$  desencadena una serie de señales intracelulares, entre las que destaca el aumento en la concentración de calcio intracelular y la activación de la proteína quinasa C (Mené et al., 1989). Las diversas acciones de la AngII en las células mesangiales se resumen en la tabla 6.

*Tabla 6. Efecto de la AngII en las células mesangiales.*

- Contracción
- Proliferación / hipertrofia
- Activación de genes tempranos (c-fos)
- Síntesis de proteínas de matriz extracelular
- Generación de mediadores de la inflamación ( $PGE_2$ , PAF)
citoquinas (IL-6)
factores de crecimiento (TGF- $\beta$ )
péptidos (ET-1)

Los mecanismos que regulan los procesos inducidos por la AngII en células mesangiales apenas están estudiados. Recientemente se ha demostrado que la AngII induce la síntesis de IL-6 (Moriyama et al., 1995), gen cuyo promotor es un sitio de unión del factor nuclear kappa (NF- $\kappa$ B), lo que sugiere que la AngII podría activar este factor de transcripción, pero se desconocen los mecanismos de transferencia de la información hacia el núcleo en respuesta a la AngII en células mesangiales. El factor nuclear NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción muy ubicuo que participa en la regulación de la expresión de genes relacionados con la inflamación, como moléculas de adhesión de leucocitos y citoquinas (Satriano et al., 1994; Suzuki et al., 1994)

## 7. PAPEL DE LA ANGII EN LA ESCLEROSIS RENAL

### 7.1. AngII y proliferación de células renales

La posibilidad de que la AngII pudiera afectar a la replicación celular fue sugerida por primera vez en 1972, por Kharaitallah, Robertson y Davila, cuando demostraron que la infusión intravenosa de AngII en ratas provocaba un aumento en la cantidad de DNA en la aurícula, los ventrículos, la corteza y la médula adrenal (Kharaitallah et al., 1972).

El efecto de la AngII sobre el crecimiento de las células renales ha sido estudiado por diversos autores (tabla 7). La AngII tiene un claro efecto hipertrófico, no proliferativo en células epiteliales tubulares proximales (Wolf et al., 1993a,b), mediado por el receptor  $AT_1$  que, a diferencia de otros tipos celulares, no estimula el metabolismo de los fosfatidilinosítoles y provoca una disminución del AMP cíclico. Sin embargo, en la literatura existe una gran controversia con respecto a su efecto sobre la proliferación de células mesangiales. Algunos autores han encontrado que la AngII induce

proliferación mientras que otros observan hipertrofia (tabla 7). Este hecho puede explicarse en parte por las diferentes condiciones de cultivo (cultivo primario, número de pases, grado de confluencia) y por el origen de las líneas celulares (rata, murino y humano). Recientemente se ha descrito que la AngII induce proliferación de células endoteliales glomerulares (Wolf et al., 1995).

**Tabla 7.** Efecto de la AngII sobre el crecimiento de células renales.

Tipo celular	Origen	Efecto	Autor*
CM	rata	Proliferación	Fujiwara et al 1988
CM	rata	Hipertrofia	Homma et al 1990
CM	rata	Proliferación	Wolthius et al 1992
CM	rata	Proliferación	Marinides et al 1993
CM	rata	Hipertrofia	Kagami et al 1994
CM	murino	Proliferación	Wolf et al 1992
CM	murino	Hipertrofia	Anderson et al 1993
CM fetales	humano	Proliferación	Ray et al 1994
CTP	murino	Hipertrofia	Wolf et al 1993
CTP	Cerdo	Hipertrofia	Wolf et al 1993
CTP	conejo	Hipertrofia	Donnelly et al 1990
CEndG	rata	Proliferación	Wolf et al 1995

\*Nota: Revisado en Egido, 1996.

Abreviaturas: CM, células mesangiales; CTP, células de túbulo proximal; CEndG, células endoteliales glomerulares.

## 7.2. AngII y matriz extracelular

En los últimos cinco años diversos estudios han demostrado que la AngII estimula la síntesis de proteínas de matriz extracelular en células mesangiales, epiteliales tubulares y vasculares de músculo liso (tabla 8). Además, la infusión sistémica durante 7 días de AngII en ratas normales, induce un aumento en la proliferación de células residentes glomerulares y un incremento de la síntesis de fibronectina y de colágeno tipo IV (Johnson et al., 1992).

**Tabla 8.** Efecto de la AngII sobre la síntesis de proteínas de matriz extracelular.

Tipo celular	Efecto	Autor
CM rata	Col	Homma et al 1990
Cm rata	FN	Wolthius et al 1992
CM rata	FN, Col I, heparan sulfato	Kagami et al 1994
CM rata	FN, Col IV	Ruiz-Ortega et al 1994*
CM murino	FN, Col I	Wolf et al 1992
CMH fetales	FN	Ray et al 1994
CTP	Col IV	Wolf et al 1993b
CMLV	FN	Hanh et al 1993

\*Nota: Resultados presentados en este trabajo.

Abreviaturas: CM, células mesangiales; CMH, células mesangiales humanas; CTP, células de túbulo proximal; CMLV, células de músculo liso vascular.



### 7.3. AngII y factores de crecimiento

Muchos de los efectos proliferativos y fibrogénicos de la AngII están mediados por la interacción de este péptido y factores de crecimiento. En células renales, la AngII estimula la síntesis de factores de crecimiento, como el PDGF (Wolf et al., 1994) y el TGF- $\beta$  (Kagami et al., 1994), de sustancias vasoactivas, como la ET-1 (Kohno et al., 1992), de citoquinas, como la IL-6 (Moriyama et al., 1995) y de lípidos, como el PAF (Schlondorff et al., 1986).

La mayor parte de los estudios han sido realizados en células de músculo liso vascular. En estas células, la AngII estimula la expresión del PDGF y del protooncogen relacionado con el crecimiento c-fos (Naftilan et al., 1989). Recientemente se ha demostrado que la AngII puede dar lugar a una respuesta celular diferente provocando hiperplasia o hipertrofia celular, dependiendo del equilibrio en la síntesis endógena de factores de crecimiento. La vía de la proliferación inducida por la AngII se produce a través del bFGF y del PDGF, mientras que la vía antiproliferativa está mediada por el TGF- $\beta$  (Itoh et al., 1993).

En células epiteliales tubulares se ha demostrado que la estimulación de la hipertrofia y la síntesis de colágeno inducida por la AngII está mediada por la liberación de TGF- $\beta$ . Además, la AngII potencia el efecto proliferativo del EGF en este tipo celular (revisado en Wolf et al., 1993 b).

En células mesangiales se ha demostrado que parte del efecto proliferativo de la AngII es a través de la síntesis de IL-6 (Moriyama et al., 1995) y de ET-1 (Bakris et al., 1993).

## **OBJETIVOS**

El empleo de los inhibidores de la ECA en diversas nefropatías experimentales y humanas, asociadas a hipertensión, ha sugerido que el sistema renina angiotensina (RAS) juega un papel importante en la patogenia del inicio y progresión del daño renal. Sin embargo, la participación de este sistema en enfermedades renales normotensas, así como la posible activación de sus diversos componentes a nivel renal, apenas han sido estudiados. Por lo tanto, en un modelo normotenso de nefritis por inmunocomplejos hemos determinado la implicación del RAS local en la patogenia de las lesiones glomerulares y tubulointersticiales.

En estudios *in vitro* hemos abordado la hipótesis de que la AngII, péptido efector del RAS, podría regular el crecimiento celular y la síntesis de proteínas de matriz en células mesangiales y fibroblastos intersticiales, principales células implicadas en los procesos de esclerosis renal.

## **LOS OBJETIVOS CONCRETOS SON LOS SIGUIENTES:**

### **I. En experimentos *in vivo* pretendemos estudiar:**

1. El efecto del quinapril, un inhibidor de la ECA de alta fijación tisular, en la evolución clínica y morfológica del daño renal en un modelo de nefritis no asociado a hipertensión.
2. La actividad y/o expresión génica de los componentes del RAS a nivel renal en este modelo de nefritis, así como su modificación por el quinapril.
3. El efecto de la inhibición de la ECA sobre el acúmulo de matriz proteica (fibronectina y colágenos) y la expresión génica de factores de crecimiento (TGF- $\beta$  y ET-1) y factores quimiotácticos (MCP-1) relacionados con la progresión del daño renal.

### **II. En experimentos *in vitro* pretendemos estudiar :**

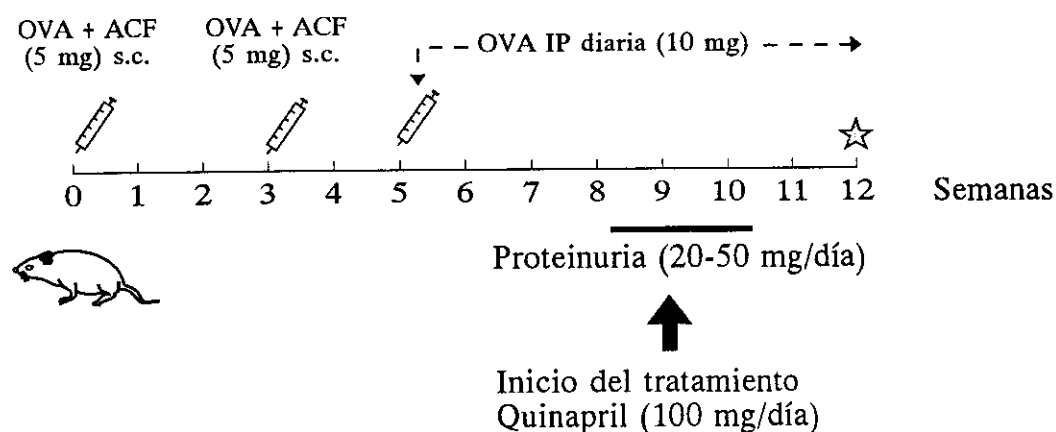
1. El efecto de la AngII sobre la proliferación y la síntesis de matriz extracelular en células mesangiales y fibroblastos intersticiales, así como los mecanismos implicados en esos procesos.  
El posible sinergismo entre algunas citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) y la AngII en la proliferación celular y la síntesis de proteínas de matriz por células mesangiales.
2. La participación de la AngII en el proceso de reclutamiento de células mononucleares a nivel renal, con particular atención a la síntesis y expresión del MCP-1 y a la activación del factor nuclear NF-kB en células mesangiales.
3. La implicación de mediadores del daño renal en la regulación de la expresión de alguno de los componentes del RAS en células renales en cultivo.

## **MATERIALES Y METODOS**

## 1. METODOLOGÍA UTILIZADA EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES

### 1.1. Diseño experimental

Los estudios fueron realizados en ratas Wistar hembras con pesos iniciales de 200-220 gramos, distribuidas en grupos de 30-40 animales. La enfermedad se indujo según un protocolo previamente descrito (Sánchez-Crespo et al., 1982; Noble et al., 1990), como se muestra en la figura 14. Los animales recibieron una dosis inicial subcutánea de 5 mg de ovoalbúmina (OVA) (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo) disuelta en solución salina 0.9% (20mg/ml) y el mismo volumen de adyuvante completo de Freund (ACF), y tres semanas más tarde, la misma dosis en adyuvante incompleto de Freund (IAF). Una semana después, se comenzó la administración diaria intraperitoneal (IP) de 10 mg de OVA en solución salina (20mg/ml), que se realizó hasta el sacrificio del animal. La proteinuria aparece alrededor de la novena semana.



**Figura 14.** Esquema del protocolo experimental de inducción de la nefritis. La nefritis por inmunocomplejos se indujo en ratas normotensas.

Cuando la proteinuria alcanzó entre 20-50 mg/día los animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos:

- \* **Nefritis no tratada:** Animales que desarrollan espontáneamente la nefritis.
- \* **Tratados con quinapril:** Animales con nefritis que son tratados con el inhibidor de la ECA quinapril (donado por Parke Davis en forma de hidrocloreuro en polvo) a la concentración 100 mg/l, durante 21 días, suministrado en el agua de bebida y reemplazado cada 48 h.

Tres semanas después del inicio de la proteinuria, los animales fueron sacrificados y se recogieron muestras de sangre y de tejido renal. También se realizó un estudio paralelo en animales sanos de la misma edad, con o sin tratamiento, utilizados como control.

## 1.2. Estudios clínicos. Bioquímica

La proteinuria se determinó por el método del ácido sulfosalicílico. Los resultados se expresan como miligramos de proteína por día. La creatinina en orina y los parámetros del suero, creatinina, proteínas totales y colesterol total fueron medidos por métodos enzimáticos en un autoanalizador de multicanales. El aclaramiento de creatinina se calculó a partir de 3 muestras de orina de 24 h tomadas en las 72 h previas al sacrificio del animal.

## 1.3. Determinación de la presión arterial

La presión arterial sistólica fue medida en ratas conscientes, indirectamente con un esfigmomanómetro en la arteria dorsal del rabo (NARCO Biosystems, Colorado). El valor de la presión sanguínea para cada rata fue calculado como la media de tres medidas separadas en cada sesión.

## 1.4. Procesamiento del tejido renal

En el momento del sacrificio, los animales fueron anestesiados con 5 mg/100 g de pentobarbital sódico. Los riñones se perfundieron *in vivo* vía la aorta abdominal con 100 ml de salino a 4°C. La perfusión renal se realizó canulando la aorta abdominal a la altura de la bifurcación, tras abrir un orificio en la vena cava inferior y clampar la aorta a su entrada en el abdomen (Eddy et al., 1986). Las muestras de sangre fueron recogidas, centrifugadas y almacenadas a -80°C para determinar la actividad de la ECA. Los riñones fueron extraídos y procesados para los estudios histopatológicos, determinación de la actividad ECA, extracción de RNA e hibridación *in situ*.

### 1.4.1. Aislamiento de glomérulos

Los glomérulos fueron extraídos mediante el paso por tamices de diferente tamaño (Striker et al., 1985), lavados con PBS y resuspendidos en agua didestilada. Las muestras se homogeneizaron y se centrifugaron a 12000g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó para el análisis de la actividad de la ECA. Todas las preparaciones utilizadas contenían más de un 95% de glomérulos con una contaminación tubular mínima.

### 1.4.2. Aislamiento de las membranas del borde en cepillo de las células epiteliales tubulares

Las membranas del borde en cepillo de las células epiteliales tubulares fueron aisladas a partir de la corteza renal, usando el método de Malathi basado en una agregación por calcio, seguida de centrifugación diferencial (Malathi et al., 1979). El precipitado final conteniendo las membranas del borde en cepillo fue resuspendido en 0.3% Tritón X-100 para la medida de la actividad enzimática y posteriormente se almacenó a -80°C.

### 1.5. Medidas de actividad de la ECA

El tejido para determinar la actividad enzimática de la ECA se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su estudio. Las muestras (separadas en corteza y médula) fueron homogeneizadas en agua didestilada y centrifugadas a 12000 g durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se utilizó para el análisis de la actividad tisular. En un grupo de estudio se aislaron los glomérulos y las membranas del borde en cepillo de las células epiteliales tubulares, según se ha descrito anteriormente.

#### 1.5.1. Medida de la actividad enzimática de la ECA

La actividad de la ECA en suero se determinó por un método espectrofotométrico (Sigma) basado en la reacción enzimática



catalizada por la ECA, donde el furilacilfenilnilglicilglicina (FAPGG) es hidrolizado a furacilfenilalanina (FAP), la hidrólisis de FAPGG produce una disminución de la absorbancia a 340nm que es directamente proporcional a la actividad de la ECA en la muestra.

La actividad de la ECA en muestras de tejido se expresan como unidades relativas por miligramo de proteína, determinado por el método de Lowry. Los resultados del suero se expresan como unidades por ml.

### 1.6. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Para los estudios estadísticos se utilizó el programa estadístico Instat, empleando el test "t" de Student. Se consideraron significativas las diferencias de  $p < 0.05$ .

## 2. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS RENALES

### 2.1. Morfología Renal

El tejido para microscopía óptica fue fijado en formol tamponado e incluido en parafina. Secciones de 2-3  $\mu\text{m}$  de grosor fueron preparadas y teñidas con hematoxilina-eosina, PAS, plata metenamina y tricrómico de Masson.

La glomeruloesclerosis fue definida como la desaparición de elementos celulares del glomérulo, colapso de las luces capilares, y/o el plegamiento de la membrana basal glomerular con atrapamiento de material amorfo. La expansión mesangial fue definida por la presencia de material que reacciona positivamente con la tinción de PAS.

Los depósitos glomerulares se valoraron semicuantitativamente, según el criterio previamente descrito (Raij et al., 1984): 0+ ausencia de depósitos, 1+ depósitos mesangiales, 2+ depósitos mesangiales en todos los glomérulos y subendoteliales en menos del 50% de los glomérulos, 3+ depósitos mesangiales en todos los glomérulos y subendoteliales en más del 50% de los glomérulos. La celularidad glomerular fue cuantificada mediante la siguiente escala: 0+ celularidad normal, 1+ incremento leve, 2+ moderado, 3+ severo.

## 2.2. Inmunohistoquímica

El tejido para inmunofluorescencia fue sumergido en OCT (Tissue-Tek, Miles, Elkhart, IN), congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta su estudio. Secciones de 4-6  $\mu\text{m}$  fueron cortadas usando un criostato. El tejido para inmunoperoxidasa fue fijado en formol tamponado e incluido en parafina. Las secciones de 4-6  $\mu\text{m}$  se obtuvieron usando un microtomo.

### 2.2.1. Depósitos de inmunocomplejos

Para determinar la localización y naturaleza de los depósitos se realizó inmunofluorescencia directa. Las secciones de tejido fueron teñidas con antisueros conjugados con fluoresceína frente a IgG de rata (Nordic Immunology, Tilburg, Holanda).

### 2.2.2. Infiltrado mononuclear

El infiltrado inflamatorio glomerular e intersticial fue estudiado mediante la técnica de avidina-biotina (Alexopoulos et al., 1989). Los marcadores celulares de superficie fueron identificados utilizando los distintos anticuerpos monoclonales (tabla 9). Sólo se contaron las células cuyo núcleo era claramente identificable. El recuento se realizó mediante un amplificador de imágenes. En cada biopsia se contaron quince glomérulos y quince campos de 0.45 mm<sup>2</sup> elegidos al azar. Los resultados se expresan como número de células positivas por sección glomerular o por mm<sup>2</sup> de intersticio.

### 2.2.3. Proteínas de matriz extracelular

Para determinar la distribución e intensidad de la fibronectina y colágenos, se realizaron estudios de inmunofluorescencia indirecta. Las secciones de tejido renal fueron cortadas, secadas al aire, fijadas en acetona fría e incubadas con anticuerpos contra las proteínas de matriz extracelular (tabla 9) y posterior incubación con los anticuerpos secundarios marcados con FITC. Como control de los experimentos, secciones de tejido se incubaron con suero normal de conejo, seguido de anticuerpos marcados con FITC o anticuerpo secundario solo. La cuantificación de las lesiones fue evaluada por escala semicuantitativa previamente descrita (Raij et al., 1984).



Tabla 9. *Anticuerpos empleados*

Células infiltrantes	Proteínas de matriz
OX1, específico para el antígeno común leucocitario o LCA (Sunderland et al., 1979; Seralab, Sussex, Reino Unido)	Anticuerpo policlonal anti-fibronectina plasmática de rata realizado en conejo (Quirós et al., 1990)
W3/13 para los linfocitos T (Eddy et al., 1986; Seralab, Sussex, Reino Unido)	Antisero policlonal anti-colágeno tipo III de rata realizado en conejo (Chemicon)
ED1 para la detección de macrófagos (Dijkstra et al., 1985; Serotec, Oxford, Reino Unido)	Antisero policlonal anti-colágeno tipo IV de rata realizado en cabra (Chemicon)

### 2.3. Cuantificación de los resultados

Las valoraciones de los estudios histológicos fueron realizados por más de un observador, sin conocimiento del grupo al que pertenecía el animal estudiado. Se calculó el valor medio para cada animal.

Los resultados están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Para los estudios estadísticos se utilizó el programa estadístico Instat. En los datos histológicos se usó el test de Mann-Whitney para valores no paramétricos. La correlación entre dos variables cuantitativas se estableció mediante regresión lineal. La significación se estableció en  $p < 0.05$ .

## 3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 3.1. Extracción del RNA celular y tisular

El RNA celular y de tejido fue extraído mediante la técnica de la guanidina-fenol-cloroformo en ácido (Chomczynski et al., 1987). Para la extracción del RNA de tejido renal, el riñón fue dividido en corteza y médula, e inmediatamente fue congelado en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su estudio. El tejido se lisó empleando un homogenizador. Para la extracción del RNA celular, las células se incubaron con los diferentes estímulos a distintos tiempos. Se eliminó el medio celular, se lavaron con PBS frío y se lisaron las células.

Una vez purificado el RNA, se cuantificó por medida de la absorbancia de las muestras a 260 nm (1 unidad de absorbancia corresponde a 40  $\mu\text{g/ml}$  de RNA) y se comprobó que la relación entre las absorbancias a 260 y 280 era cercana a 2, indicando la ausencia de contaminación proteica.

### 3.2. Análisis de Northern blot

El RNA total (de 10 a 40  $\mu\text{g}$ ) fue desnaturalizado y sometido a electroforesis en un gel de 1% agarosa-formaldehído y transferido capilarmente a membranas de nylon (Genescreen, New England Nuclear, Boston, MA, USA). Mediante tinción con bromuro de etidio, se comprobó en cada gel la carga equivalente de RNA, la ausencia de degradación, la posición de los RNA ribosomales 28S y 18S así como la eficacia de la transferencia por capilaridad.

### 3.3. Análisis de dot blot

Se realizaron diluciones seriadas del RNA total de la muestra problema (diluciones 1:2 a partir de 40 µg) que tras desnaturalizarlas se fijaron en una membrana de nylon mediante vacío, usando un aparato de slot-dot.

Para ambos métodos, el RNA fue fijado a la membrana de nylon durante 90 minutos.

### 3.4. Prehibridación e hibridación

Las membranas fueron prehibridadas durante al menos 4 h a 42°C en solución de hibridación (50% formamida, 1% SDS, 5x SSC, 5x solución de Denhardt, 0.25 mg/ml de esperma de arenque desnaturalizado y 50mM tampón fosfato sódico, pH=6.5). La hibridación se realizó a 42°C toda la noche con 20% sulfato de dextrano y la sonda de DNA marcada y desnaturalizada (ver a continuación los protocolos de preparación y marcaje de las sondas). Una vez finalizada la hibridación, se procedió al lavado del exceso de sonda de las membranas en 2x SSC, 0.1% SDS, durante 30 min a temperatura ambiente y dos veces con 0.2x SSC, 0.1% SDS, a 55°C durante 15 min. La autorradiografía se realizó según técnicas estándar. Las hibridaciones con sondas de RNA se realizaron en condiciones similares, a temperaturas superiores (hibridación a 55°C, lavado a 65°C).

Las membranas fueron rehibridadas después de eliminar la sonda anterior mediante lavado a 90°C durante 1 min en agua didestilada.

### 3.5. Sondas utilizadas

Las sondas de cDNA usadas fueron los colágenos ( $\alpha$ 1)I (Hf677), ( $\alpha$ 1)III (Hf939) y ( $\alpha$ 1)IV (pCVIV-1-PE16), 28S, TGF- $\beta$ 1 humana (obtenidos de la American Type Culture Collection, Rockville, MD), la sonda del IP-10 (clonada en el laboratorio por M. Gómez-Chiarri) y ciclofilina B humana (pBHLCP9, SmithKline Beecham). Fueron crecidas y purificadas mediante técnicas estándar (Maniatis et al., 1989) y marcadas radioactivamente por "nick translation" (Boehringer Mannheim, Germany) con  $\alpha$ -<sup>32</sup>[P]dCTP (DuPont, Boston, MA, USA).

El resto de las sondas de cDNA se utilizaron en forma de fragmentos. La fibronectina de rata (SR270), se empleó en forma de fragmento de 270 pb, producto de la restricción con EcoRI (donada por R.O.Hynes, Massachusetts Institute of Technology (French-Constant et al., 1989)), TGF- $\beta$ 1 murino, usada como fragmento de 279 pb producto de restricción con EcoRI (donada por M.D. Fuad N. Ziyadeh, University of Pennsylvania (Sharma et al., 1994)) y MCP-1 humano (JE/pGEM-hJE34) fueron marcados por el método de "random primer" (Boehringer Mannheim, Germany) con  $\alpha$ -<sup>32</sup>[P]dCTP.

El cDNA para el receptor AT<sub>1</sub> de la angiotensina II (donada por K. Berstein, Emory, University School of Medicine (Murphy et al., 1991) fue utilizado como ribosonda. El plásmido pGEM3Z (Promega) fue linearizado con Hind III usando el promotor T7 y se obtuvo un RNA antisentido. El transcrito total antisentido fue usado para la hibridación. Fue marcada utilizando un kit comercial (Boehringer Mannheim, Germany) con  $\alpha$ -<sup>32</sup>[P]CTP.

### 3.6. Hibridación *in situ*

La hibridación se realizó con ligeras modificaciones según un protocolo previamente descrito (Martínez-Montero et al., 1991). Secciones de 4 $\mu$ m, de tejido incluido en parafina, se montaron sobre un portaobjetos (pretratado con APES al 2% en acetona (v/v)). El tejido se fijó con 1.5% paraformaldehído-1.5% glutaraldehído y se desparafinó con xileno. Posteriormente, se trataron en medio ácido para eliminar proteínas. Las muestras se hibridaron a 42°C durante toda la noche en una solución de hibridación (4x SSC, 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2x solución Denhardt, 0.1 mg/ml de azida sódica, sulfato de dextrano al 20% en formamida (p/v) pH=6.5) en presencia de 0.5 ng/ $\mu$ l de la sonda marcada con digoxigenina y desnaturalizada. El exceso de sonda se lavó con 0.2x SSC. Finalmente se reveló el experimento con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, y posterior incubación con NBT (0.4%)/X-fosfato (0.32%) durante el tiempo necesario para la aparición del color (1-3 h). La reacción se detuvo lavando con tampón TBE. Como control se realizaron experimentos en presencia de la ribosonda sentido marcada con digoxigenina.

#### 3.6.1. Ribosondas empleadas, Marcaje

El plásmido conteniendo un fragmento del DNA de la preproET-1 de rata de 180 pares de bases (Núñez et al., 1991) se amplificó mediante la técnica de PCR y se subclonó dentro del plásmido PMAM neoblu. Las ribosondas de la ET-1, sentido y antisentido, se sintetizaron a partir del plásmido linealizado, mediante la T3 y la T7 polimerasas (respectivamente) en presencia de digoxigenina-11-UTP, utilizando un kit comercial (Boehringer Mannheim).

### 3.7. Estudios de RT-PCR

#### 3.7.1. Reacción de transcripción inversa (RT)

El RNA se transcribió a cDNA para utilizarlo en cada reacción de amplificación con polimerasa (PCR). Para los estudios con animales, se mezclaron cantidades iguales de RNA procedentes de varios animales de cada grupo (n=4-6). Un  $\mu$ g de RNA se transcribió a cDNA mediante incubación con 20 $\mu$ l de tampón de transcripción (5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl (pH=8.8), 50mM KCl, 0.1% Tritón X-100, 1mM mezcla de dNTPs, 20U inhibidor de ribonucleasa, 15U transcriptasa inversa del virus Moloney de aves (AMV) y 50 ng de una mezcla aleatoria de hexámeros) durante 45 min a 42°C, según las instrucciones del proveedor (Promega, Madison, WI).

#### 3.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación se realizaron con cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias de los genes estudiados. En la tabla 10 se resumen las secuencia de los cebadores y el tamaño del fragmento amplificado y las condiciones de PCR utilizadas. Cada PCR se realizó en un volumen final de 20 $\mu$ l (4 $\mu$ l de reacción de transcripción inversa, 2 $\mu$ l tampón de PCR10x, 10pmoles de los cebadores sentido y antisentido correspondientes,  $\alpha$ -dCTP[<sup>32</sup>P] y 1.4U de Taq polimerasa). El rango lineal de cada reacción de amplificación fué determinado experimentalmente para cada gen.

Los productos de la PCR (2-4  $\mu$ l) se analizaron mediante dos tipos de geles, agarosa y de urea/4% acrilamida. Para los geles de agarosa al 1.5% (Maniatis et al., 1990) las muestras se resuspendieron en tampón de carga y se sometieron a electroforesis durante 2-3 h. Una vez finalizada la electroforesis, el DNA se desnaturalizó y se transfirió una membrana Genescreen por capilaridad en NaOH 0.4 N durante 4-8 h y se expusieron las membranas para autorradiografía. Los geles de urea/acrilamida se sometieron a electroforesis, se secaron y se expusieron para autorradiografía.

**Tabla 10.** Condiciones de las PCR empleadas.

GEN * cebador antisentido * cebador sentido	Tamaño inserto (pb)	Cond (t, Temp)	número ciclos (n)
G3PDH 5'-ATACTGTTACTTATACCGATG-3' 5'-AATGCATCCTGCACCACCAA-3'	515	1 min a 54°C	30
Ao 5'-CCAGCCGGGAGGTGCAGT-3' 5'-TTCAGGCAAGACCTCCC-3'	308	1 min a 63°C	30
ECA 5'-GTCCAGCCAGCTCTGGGCCCACATGTC-3' 5'-GGATCCAACAAGACTGCCACCTGCTGG-3'	406	1 min a 61°C	30
Prepro-ET-1 5'-TCTTTTACGCCTTTCTGCATGGTAC-3' 5'-TGATCTTCTCTCTGCTGTTTGTGG-3'	409	1 min a 59°C	30
MCP-1 5'-GGTCACTTCTACAGAAGTCC-3' 5'-TTCTGGGCCTGTTGTTTCAACA-3'	409	45 seg a 54°C	25

### 3.8. Análisis densitométrico y expresión de resultados

Las películas de autorradiografía fueron escaneadas usando el densitómetro Image Quant (Molecular Dynamics, CA, USA). Los datos se expresan en unidades arbitrarias de densitometrado.

Los resultados de Northern blot fueron corregidos mediante la hibridación con la sonda de 28S, igualándose los valores de carga de RNA. Los resultados de la hibridación con las distintas sondas se expresan como incremento respecto al control (n-veces).

Para determinar la validez del método de dot-blot se realizó un análisis de regresión lineal de los datos obtenidos del densitometrado, usando sólo aquellos dot donde la correlación era  $r=0.99$ . Para comparaciones cuantitativas, la densidad de los dot fueron corregidas por la densidad del 28S de la misma dilución. Los valores resultante fueron divididos por los de los animales control. Los resultados se expresan como incremento respecto al control (n-veces) de media  $\pm$  EEM de los animales estudiados de cada grupo.

Los resultados de RT-PCR fueron corregidos con respecto a la expresión de la G3PDH de cada muestra y se expresan como incremento respecto al control (n-veces) de media  $\pm$  EEM de las reacciones de RT-PCR.

## 4. CULTIVOS CELULARES

### 4.1. Cultivo de células mesangiales

El cultivo de células mesangiales (CM) de rata se realiza, mediante un crecimiento diferencial de los distintos tipos renales que componen el glomérulo, según una técnica previamente descrita y estandarizada en nuestro laboratorio (Gómez-Guerrero et al., 1993). A partir de riñones de ratas Sprague-Dawley se aislaron los glomérulos, mediante el paso por distintos tamices y posterior digestión con colagenasa (50 U/ml) tipo IA (Sigma Chem., St. Louis, MO, EEUU). Finalmente se resuspendieron en medio RPMI 1640-HEPES (Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY, EEUU), suplementado con un 10% de suero de ternera fetal, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 2mM glutamina. Bajo esas condiciones las células mesangiales aparecen en cultivo después de 6-10 días, alcanzando la confluencia a los 15-18 días de cultivo. Las CM se caracterizaron por microscopía de contraste de fase, tinción positiva para desmina y vimentina, y tinción negativa para el antígeno relacionado con el factor VIII y citoqueratina, excluyendo contaminación endotelial y epitelial (Mené et al., 1989).



Figura 15. *Célula mesangial*. Microscopía óptica.

### 4.2. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas se resumen en la tabla 11. El medio de cultivo suplementado con 2mM glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina y con un 5-10% de suero, dependiendo del tipo celular. Las células se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland).

Tabla 11. Líneas celulares empleadas

Nombre	Tipo celular	Medio de cultivo	Utilidad
NRK 49F	fibroblastos intersticiales renales	RPMI (5% STF)	Estudios de interacción con AngII
U937	monocitos humanos	RPMI-Hepes (10% STF)	Estudios de interacción con AngII
CCL-64	epiteliales pulmonares de visón	DMEM (10% STF sin deconplementar)	Bioensayo de TGF- $\beta$

## 5. ESTUDIOS DE UNIÓN DE ANGIOTENSINA II

Los estudios de unión de AngII se realizaron mediante el empleo de  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]AngII (Amersham). En primer lugar se determinó el tiempo y la temperatura de la unión, realizándose todos los experimentos posteriores con la línea celular NRK49F en RPMI-0.5% BSA durante 3h a 7-10°C.

Las células, subconfluentes, crecidas en placas de 6-12 pocillos, fueron incubadas en un medio libre de suero durante 24h. Primero, las células fueron preincubadas en RPMI con 0.5% albúmina de suero bovina (BSA) durante 1h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub>, para disminuir la unión al plástico. Este medio se eliminó y se incubaron con  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]AngII (0.1nM) sólo y en presencia de AngII no marcada y de diferentes análogos o antagonistas. Pasado el tiempo de incubación las células se lavaron dos veces con PBS frío, se resuspendieron en 0.1M NaOH con 0.1% Tritón X-100 y se cuantificó la radioactividad en un contador gamma. La unión específica se calculó restando la unión al plástico a la radioactividad total unida.

## 6. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

### 6.1. Incorporación de $^3\text{H}$ -Timidina al DNA

Células subconfluentes, subcultivadas en placas de 24 pocillos, fueron incubadas durante 48h en RPMI con 0.5%STF con el fin de que todas las células se encontraran en la misma fase del ciclo celular (estado de reposo o quiescentes). Las células quiescentes se incubaron con diversos estímulos en presencia de 1 $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^3\text{H}$ -Timidina, durante 24 h. Pasado este tiempo se lavaron dos veces con tampón PBS frío y luego dos veces con 10% de ácido tricloroacético para precipitar proteínas y ácidos nucleicos y eliminar la  $^3\text{H}$ -Timidina no incorporada a células. El precipitado se solubilizó en medio básico (NaOH). Después de neutralizar el pH con HCl se añadió líquido de centelleo y se midió la radioactividad en un contador  $\beta$ . Para disminuir las diferencias en la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina en el basal entre los distintos ensayos realizados, los resultados se expresan como porcentaje de aumento con respecto al basal (cpm/pocillo).

## 6.2. Proliferación con azul de metileno

Células subconfluentes, subcultivadas en placas de 96 pocillos, en estado de reposo, se incubaron con diversos estímulos. Pasado el tiempo de incubación, se lavaron las células con tampón PBS frío, para eliminar restos celulares, y se fijaron con tampón formol salino. Posteriormente se incubaron con azul de metileno retirándose el exceso de colorante mediante lavados sucesivos en tampón borato. Las células se solubilizaron en metanol: clorhídrico y se determinó la absorción a 660 nm en un lector Elisa. Como control de los experimentos de proliferación se empleó una curva con concentraciones crecientes de STF. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de absorción, como incremento respecto al control negativo (actimonicina D, inhibidor de la síntesis de RNA) (Oliver et al., 1989).

## 6.3. Análisis del ciclo celular

Células subconfluentes quiescentes, cultivadas en placas petri de 75 cm<sup>2</sup>, fueron estimuladas con diversos agentes durante 24 h, utilizando 10%STF como control positivo. Al final del período de incubación, las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron. Después de la centrifugación, el precipitado celular se trató con ribonucleasa A (Sigma) 100 µg/ml y el DNA se tiñó con yoduro de propidio (Sigma) 100 µg/ml en 0.005% Nonidet P-40 (Sigma). La muestra teñida se mantuvo en la oscuridad a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo. El análisis se realizó en un citómetro de flujo EPICS-C (Coulter, Hialeah, FL). El análisis de ciclo celular se llevó a cabo con el programa PARA-1 (Hedley et al., 1983).

# 7. ESTUDIOS DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

## 7.1. Cuantificación de la síntesis de fibronectina.

La síntesis *de novo* de fibronectina, en respuesta a diferentes estímulos, se determinó mediante marcaje metabólico con <sup>35</sup>S-Metionina y posterior inmunoprecipitación con anticuerpos anti-fibronectina (Takasaki et al., 1991). Las células en estado de reposo, subcultivadas en placas de 24 pocillos, se marcaron metabólicamente con 20µCi/ml de <sup>35</sup>S-Metionina en un medio deficiente en metionina, en presencia de diferentes estímulos. Pasado el tiempo de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se solubilizaron las células con tampón de extracción (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.5% Tritón X-100, 2mM PMSF, 2mM EDTA y 5mM NEM, pH=7.4). Las muestras fueron inmunoprecipitadas con exceso de anticuerpo anti-fibronectina (50µg) a 4°C durante 12-14 h. A continuación, los inmunocomplejos formados se recuperaron mediante incubación durante 2h con bolitas de proteína A-Sefarosa (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Las bolitas fueron lavadas con tampón de extracción, para eliminar la radiactividad libre y las proteínas no unidas específicamente, haciéndose un último lavado en ausencia de detergente. La FN se liberó de los complejos calentándola a 100°C durante 5 min en tampón de electroforesis y se analizó mediante electroforesis en geles de

poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, con un gel de desarrollo al 7.5% y un gel concentrante al 3%. Los geles fueron tratados con técnicas para fluorografía y expuestos para autoradiografía.

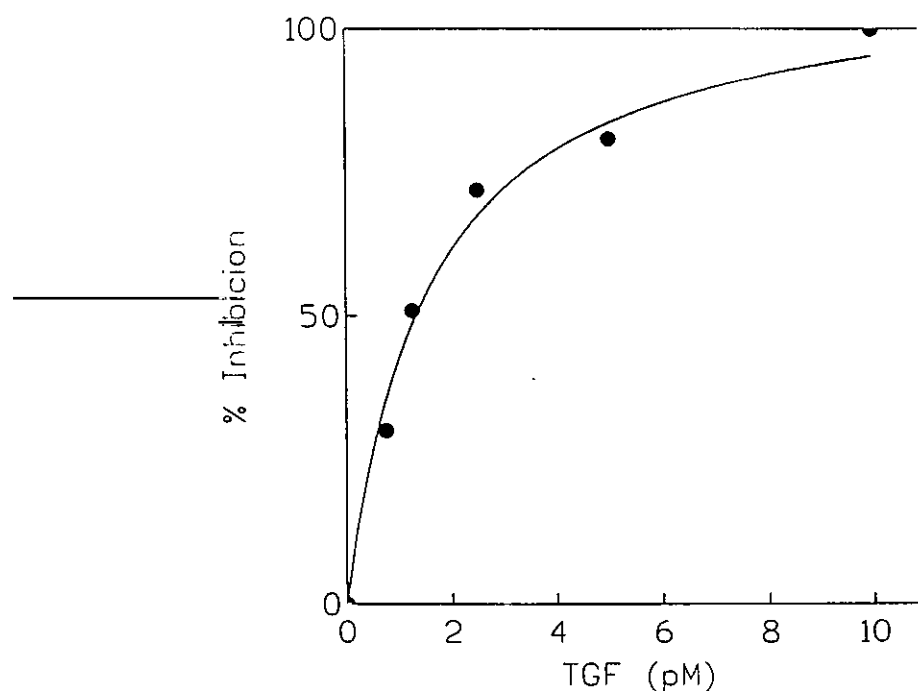
Como control negativo de la inmunoprecipitación, se empleó una IgG normal de conejo (50 $\mu$ g/ml). Como control positivo de la síntesis de FN se utilizó TGF- $\beta$ 1 recombinante humano (50pM).

## 7.2. Determinación de TGF- $\beta$ 1 por bioensayo.

La actividad de TGF- $\beta$ 1 en los sobrenadantes celulares se determinó mediante bioensayo en la línea celular CCL-64 (células epiteliales pulmonares de visón), basándose en la capacidad del TGF- $\beta$  para inhibir su crecimiento (Danierpour et al., 1989).

### 7.2.1. Medio condicionado

Las CM fueron mantenidas durante 2 días en RPMI con 0.5%STF. Después de lavarlas con PBS, las células fueron mantenidas en condiciones basales o estimuladas con PAF (10<sup>-8</sup>M) durante 24, 48 y 72 h en un medio libre de suero. Pasado el tiempo de incubación los sobrenadantes fueron recogidos y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Como control positivo de la síntesis de TGF- $\beta$  se utilizó el ester de forbol (PMA) (100nM) (Kaname et al., 1992). El TGF- $\beta$  inactivo se convirtió a su forma activa tratando los sobrenadantes celulares con 10N HCl (pH final de 1.5-2.0) durante 30 min a Tamb, y posterior neutralización con NaOH (Lyons et al., 1988).



**Figura 16. Curva del TGF- $\beta$ 1.** La línea celular CCL-64 responden al TGF- $\beta$ 1 con una disminución dosis-dependiente de la síntesis de DNA, expresada como % de inhibición del crecimiento celular con respecto al basal. Mediante la comparación con la curva estándar y multiplicando por el factor de dilución se obtiene la concentración de TGF- $\beta$  en el medio condicionado.



### 7.2.2. Bioensayo de TGF- $\beta$ 1

Las células CCL-64 fueron sembradas a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo, el medio condicionado se añadió cuando las células estaban extendidas y subconfluentes, aproximadamente a las 4-6h. Al cabo de 18h se añadió a las células  $0.5 \mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -Timidina y 6h después se reveló el experimento. Las células se lavaron dos veces con PBS y una con 10% TCA, entonces las células se resuspendieron en 0.1M NaOH con 0.1% Tritón X-100 y se cuantificó la radiactividad asociada al DNA celular.

La actividad del TGF- $\beta$  se cuantificó comparando con una curva estándar realizada con concentraciones crecientes de TGF- $\beta$  recombinante (figura 11). El medio condicionado se administró a las CCL-64 en un rango de diluciones de 1:4 a 1:20 para caer dentro de la zona lineal de la curva estándar. La especificidad del ensayo se determinó mediante neutralización de la actividad del TGF- $\beta$  con un anticuerpo anti-TGF $\beta$  y una IgG control.

### **7.3. Determinación de MCP-1 mediante Western blot**

La síntesis de MCP-1 se determinó mediante análisis de Western blot de los sobrenadantes de células estimuladas con AngII.

#### 7.3.1. Medio condicionado

Las CM fueron mantenidas durante 2 días en RPMI con 0.5%STF. Después de lavarlas con PBS, las células fueron estimuladas con AngII ( $10^{-7}\text{M}$ ) durante 24 h. Entonces, los sobrenadantes fueron recogidos y se concentraron 10 veces mediante centrifugación, almacenándolos a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su análisis. Como control positivo de la síntesis de MCP-1 se utilizó el LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) y el TNF- $\alpha$  ( $100 \text{ U}/\text{ml}$ ) (Gómez-Chiarri et al., 1993).

#### 7.3.2. Ensayo de Western blot

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida y transferidos a membranas de PVDF en 25mM Tris, pH=8.3, 150mM glicina y 20% vol/vol metanol. Las membranas se bloquearon con 10% de leche en polvo desnatada en PBS durante 1h a  $37^\circ\text{C}$  y se incubaron durante 18h a  $4^\circ\text{C}$  con un anticuerpo anti-MCP-1. Después de lavar para eliminar el exceso de anticuerpo, se incubó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y se identificó la proteína mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham). Como control positivo se empleó MCP-1 recombinante humano.

### **7.4. Análisis estadístico**

Los resultados de los estudios de síntesis de proteínas se expresan como media  $\pm$  EEM de los experimentos realizados. La significación se estableció usando el programa GraphPAD Instat (GraphPAD Software), considerando las diferencias significativas si el valor de  $p$  es menor de 0.05.

## 8. MEDIDA DE CALCIO INTRACELULAR

Las variaciones en las concentraciones de calcio intracelular se determinaron por medida continua de la intensidad de fluorescencia (Gómez-Guerrero et al., 1996) utilizando células adheridas a cubres redondos de cristal en placas de 24 pocillos. Las células fueron marcadas con una sonda fluorescente, fura-2/AM. Los cambios de fluorescencia de las células estimuladas con AngII se midieron en un espectrofluorímetro LS50 (Perkim Elmer), que permitía la detección simultánea de dos longitudes de onda de excitación (340 y 380nm), con una emisión fija a 500nm. La lectura de la intensidad de fluorescencia (F) se integró a intervalos de 10ms y se calculó por la relación entre la fluorescencia a 340 y 380nm.

## 9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR NF- $\kappa$ B

### 9.1. Extracción de proteínas nucleares

Las células fueron incubadas con AngII durante 0 a 2 h. Entonces, se lavaron con PBS frío, se resuspendieron en tampón-A (10mM Hepes pH=7.8, 15mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 1mM ditiotretitol, 1mM PMSF). Tras mantenerlas 10 min en hielo las células fueron centrifugadas, resuspendidas en 2 ml de tampón A y homogeneizadas. Los núcleos se separaron de la fracción citosólica mediante centrifugación a 1000g durante 10min. El precipitado se resuspendió en tampón-A. Se añadió KCl 3M gota a gota hasta una molaridad final de 0.39. Las muestras se incubaron durante 1h a 4°C, se centrifugaron a 100.000g durante 30min. Los sobrenadantes, con los extractos nucleares, se dializaron en tampón-B (50mM Hepes pH=7.8, 50mM KCl, 10% glicerol, 1mM PMSF, 1mM DTT y 0.1mM EDTA). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su estudio. La concentración de proteína fue determinada por el método de BCA (Pierce).

### 9.2. Ensayo de retardo de movilidad electroforética

#### 9.2.1. Ensayo de unión

Los extractos nucleares (10 $\mu$ g) se equilibraron en tampón-B. Las muestras se incubaron durante 20min a Tamb con 0.35 pmols del oligonucleótido marcado en presencia de 50  $\mu$ g/ml de poly(dI-dC)). La reacción se paró añadiendo tampón de carga (250 mM Tris-HCl, 0.2% azul de bromofenol, 0.2% xileno cianol y 20% glicerol).

Como control del experimento se realizaron ensayos de competición. Las muestras se incubaron en tampón B durante 10min en presencia de un exceso de 100 veces de sonda fría. Posteriormente, se añadió la sonda marcada, continuándose el experimento en las mismas condiciones.

Los complejos proteína-DNA fueron separados del exceso de sonda no unida, en un gel no desnaturizante de poliacrilamida al 4% en 0.25% TBE a 150 V durante 1 h a 20°C. Una vez terminada la electroforesis los geles fueron secados y expuestos para autorradiografía.

### 9.2.2. Marcaje del oligonucleotido consenso

El oligonucleotido consenso del NF- $\kappa$ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') se marcó con  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]ATP y T4 polinucleotido quinasa, empleando un kit comercial (Promega, Madison, WI).

## 10. LISTA DE REACTIVOS

- \* Quinapril (donado por Parke-Davis, Barcelona, España)
- \* AngII (Sigma Chem., St. Louis, MO, USA)
- \* Dup723; antagonista del receptor AT<sub>1</sub> de la AngII (Losartan) (donado por Dupont, España)
- \* PD123177; antagonista del receptor AT<sub>2</sub> de la AngII (donado por Parke-Davis, Barcelona, España)
- \* ET-1 (Peninsula Laboratories, INC., Belmont, CA, USA)
- \* BQ123, antagonista del receptor ET<sub>A</sub> de la endotelina (Neosystem, Francia).
- \* PAF (1-alkil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfolina, Calbiochem), en una solución 1mM en etanol.
- \* Antagonistas de los receptores del PAF; BN-52021 (donado por Dr. Pierre Braquet, Institut Henri Beaufour, Les Plessis-Robinson, France) y WEB2086 (Boehringer Ingelheim, Austria). Fueron disueltos en dimetil sulfoxido y añadido al medio, siendo la concentración final menor del 0.01 %.
- \* Citoquinas: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1 recombinantes humanas (Immugenex, CA)
- \* Anticuerpos monoclonales anti-TGF- $\beta$ 1 y anti-MCP-1 (Immugenex)
- \* IgG de conejo (Sigma Chemical, St Louis, MO).
- \* Anticuerpo policlonal anti-fibronectina obtenido en conejo mediante inmunización con FN humana.
- \* Compuestos radiactivos:  $^{35}$ S-Metionina (1000 Ci/mmol),  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]dCTP (3000 Ci/mmol),  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]CTP (3000 Ci/mmol),  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]ATP (3000 Ci/mmol) y  $^{125}$ I-[Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>]AngII fueron obtenidos de Amersham (Buckinghamshire, UK).  $^3$ H-Timidina (70 Ci/mmol) de New England Nuclear (Boston, MA).
- \* Medios de cultivo y suero de ternera fetal (Gibco BRL, Paisley, Scotland, UK). Tripsina (0,05 %)/EDTA (0,5 mM) (Wittaker, Walkersville, MA, EEUU)
- \* Plásticos de cultivo de Nunc (Lab Clinics)
- \* El resto de los reactivos empleados se obtuvieron de Sigma.

## **RESULTADOS**

### **Estudios *In vivo***

## 1. EFECTO DE LA INHIBICION DE LA ECA

Los iECA han demostrado ser muy eficaces en el tratamiento de enfermedades renales caracterizadas por hipertensión sistémica, como en el modelo de masa renal reducida y la nefropatía diabética (revisado en Brunner 1992). Estudios recientes han mostrado que los iECA disminuyen la proteinuria incluso en sujetos normotensos (Praga et al., 1992; Lewis et al., 1993). Sin embargo, el papel de estos fármacos en nefritis de origen inmune no asociada a hipertensión arterial apenas ha sido estudiado. Este aspecto es muy importante ya que la mayor parte de las glomerulonefritis humanas son originadas por inmunocomplejos.

Hemos abordado el estudio del efecto del tratamiento con quinapril, un iECA con alta fijación tisular (Johnston et al., 1992; Warworth et al., 1991), en la evolución clínica y morfológica de un modelo inmune inducido mediante hiperinmunización con ovalbúmina en ratas normotensas. La administración del fármaco se realizó una vez iniciado el daño renal, en un intento de aproximación a la terapia empleada en humanos.

### 1.1. Evolución de la enfermedad

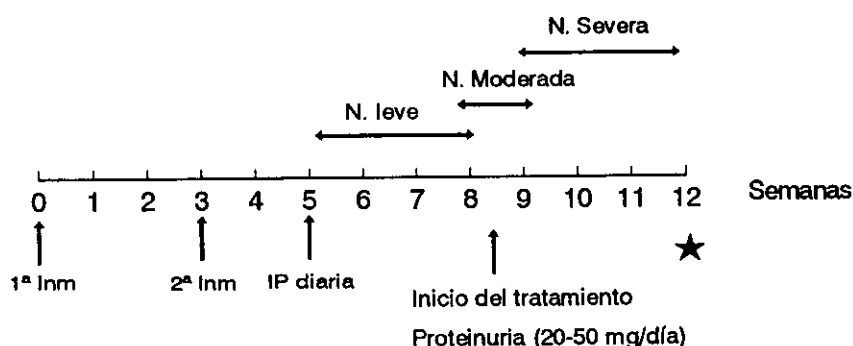
Estudios previos de nuestro grupo han descrito las características de este modelo de nefritis inmune (Sánchez-Crespo et al., 1982; Quirós et al., 1990), definiendo tres fases evolutivas (figura 17): *Fase 1:* Los animales permanecen en este periodo de nefritis leve durante varias semanas después del comienzo de la administración diaria de ovalbumina. Esta fase se caracteriza por la presencia de depósitos mesangiales de inmunocomplejos y mínima inflamación glomerular. La eliminación de proteínas en orina ( $< 10$  mg/día) y la función renal (aclaramiento de creatinina  $308 \pm 14$   $\mu$ l/min/100g) están dentro de los límites fisiológicos.

*Fase 2:* En la fase moderada de la enfermedad, la proteinuria aumenta repentinamente (20-100 mg/día) por encima de los límites normales, pero la función renal está preservada. Aparecen depósitos inmunes en la pared capilar glomerular, tanto subendoteliales como subepiteliales.

*Fase 3:* En la fase severa de la enfermedad, la proteinuria es intensa ( $> 100$  mg/24h), se desarrolla un síndrome nefrótico florido y, después de 10-14 días, la función renal se deteriora, muriendo algunos animales a las 2-3 semanas del comienzo de la proteinuria.

La transición desde la primera a la segunda fase ocurre súbitamente; aparece proteinuria patológica ( $> 20$  mg/día) que en pocos días se hace masiva. El momento de inicio de la proteinuria patológica varía de un animal a otro dependiendo de su respuesta inmune. Algunos animales no desarrollan la enfermedad (alrededor del 30%). Para prevenir esta variabilidad el tratamiento fue administrado una vez que había comenzado la evolución a la fase moderada.

Cuando la proteinuria alcanzó valores entre 20-50 mg/día los animales se distribuyeron al azar en dos grupos: tratados con quinapril ( $33 \pm 10$  mg/día,  $n=10$ ) y no tratados ( $30 \pm 14$  mg/día,  $n=12$ ;  $p=n.s.$ ). Después de 3 semanas de seguimiento los animales fueron sacrificados. El quinapril se administró a la dosis de 100 mg/l (suministrado en el agua de bebida).

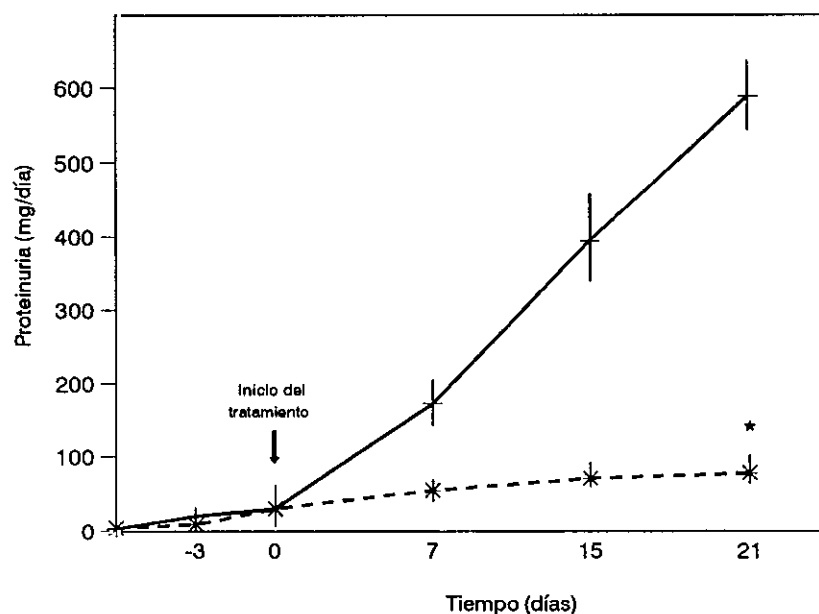


**Figura 17.** Evolución de la nefritis por inmunocomplejos. La proteinuria apareció alrededor de la novena semana; cuando alcanzó el valor de 20-50 mg/día se inició el tratamiento.

## 1.2. Evolución clínica en respuesta al tratamiento con quinapril

### 1.2.1. Evolución de la proteinuria y de la función renal

En la figura 18 se muestra la evolución de la proteinuria durante el periodo de tratamiento. Los animales que no recibieron tratamiento evolucionaron hasta alcanzar una proteinuria intensa de  $589 \pm 73$  mg/día a las 3 semanas. El tratamiento con quinapril previno el desarrollo de la proteinuria intensa, a lo largo de la evolución de la enfermedad (figura 18). Al final del periodo de estudio (21 días de tratamiento), la proteinuria en las ratas con nefritis tratada con quinapril se redujo significativamente con respecto a la nefritis no tratada ( $79 \pm 28$  vs  $589 \pm 73$  mg/día;  $p < 0.005$ ).



**Figura 18.** Evolución de la proteinuria. La figura muestra la proteinuria de ratas con nefritis no tratada (—) y tratada con quinapril (---). Los animales con nefritis no tratada desarrollaron proteinuria masiva. El tratamiento con quinapril previno el desarrollo de proteinuria intensa. Un grupo paralelo de animales sanos control, con y sin tratamiento, que presentaban valores normales de proteinuria ( $3 \pm 8$  mg/día) fue estudiado simultáneamente. Los datos se muestran como media  $\pm$  EEM.  $n=10-12$  por grupo. \* $p < 0.005$  vs nefritis.

Los animales con nefritis no tratada desarrollaron insuficiencia renal moderada (aclaramiento de creatinina  $236 \pm 52$  vs  $307 \pm 21$   $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$  de ratas sanas de la misma edad;  $p < 0.01$ ). En las ratas con nefritis tratada con quinapril se observó una mejora en la función renal con respecto a la nefritis no tratada ( $310 \pm 60$   $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ ).

### 1.2.2. Parámetros bioquímicos

Las ratas con nefritis presentaron hipoproteinemia e hipercolesterolemia (tabla 12). En respuesta al tratamiento con quinapril, al final del periodo de estudio, se observó un aumento significativo en las proteínas totales y una disminución en los niveles de colesterol en el suero comparado con la nefritis no tratada (tabla 12).

Tabla 12: Parámetros bioquímicos en la nefritis experimental por inmunocomplejos.

Grupo	(n)	Prot.Tot. (g/dl)	Colesterol (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
Nefritis	(6)	$4.6 \pm 0.5\#$	$330 \pm 11\#$	$1.0 \pm 0.1\#$
Nefritis-quinapril	(11)	$5.9 \pm 0.1^*$	$161 \pm 20^*$	$0.9 \pm 0.01^\Delta$
Control	(12)	$6.5 \pm 0.3$	$65 \pm 13$	$0.8 \pm 0.1$
Control-quinapril	(12)	$6.5 \pm 0.3$	$65 \pm 22$	$0.8 \pm 0.07$

Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM

\* $p < 0.005$ ,  $\Delta p < 0.01$  nefritis tratada con quinapril vs no tratada

# $p < 0.005$ , nefritis no tratada vs controles

### 1.2.3. Tensión arterial

En todos los grupos la tensión sanguínea permaneció en el rango normotenso a lo largo de las 3 semanas de estudio. Al final del periodo de seguimiento (figura 19), no se observaron cambios en la tensión sanguínea en las ratas con nefritis ( $119 \pm 7$  mm Hg) frente a los controles sanos de la misma edad ( $118 \pm 7$  mm Hg). El tratamiento con quinapril no modificó la tensión, ni en ratas con nefritis ( $117 \pm 11$  mm Hg) ni en los controles sanos ( $115 \pm 8$  mm Hg) ( $p = \text{n.s.}$ ).

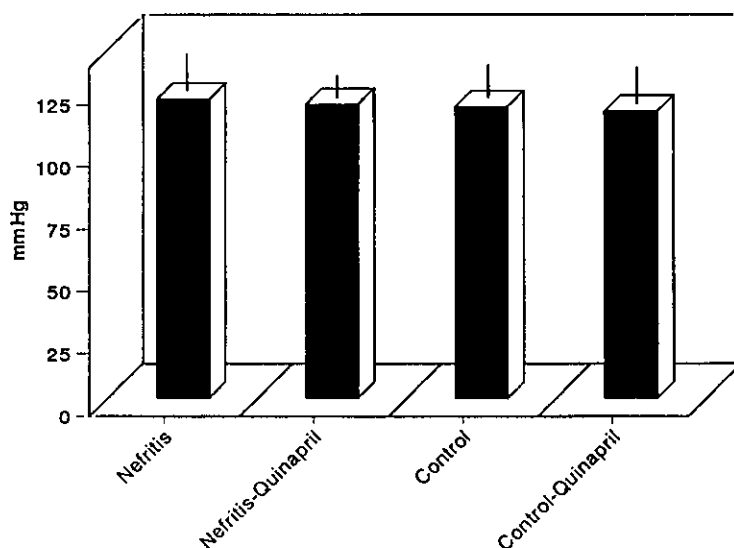


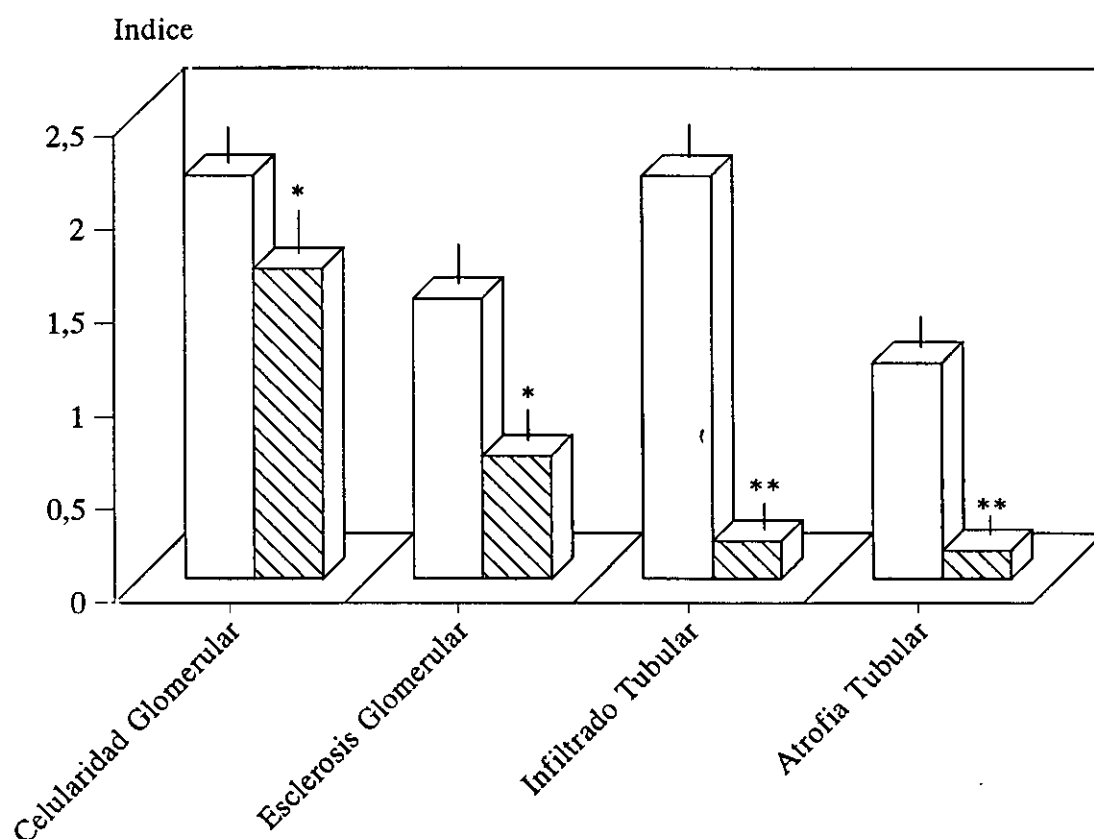
Figura 19. Medida de la tensión arterial. La figura muestra la tensión arterial, determinada mediante un esfigmomanómetro en la arteria de la cola. Las barras representan la media  $\pm$  EEM al final del periodo de estudio.  $n = 5-6$  por grupo.

### 1.3. Estudios morfológicos

#### 1.3.1. Estudios de microscopía óptica

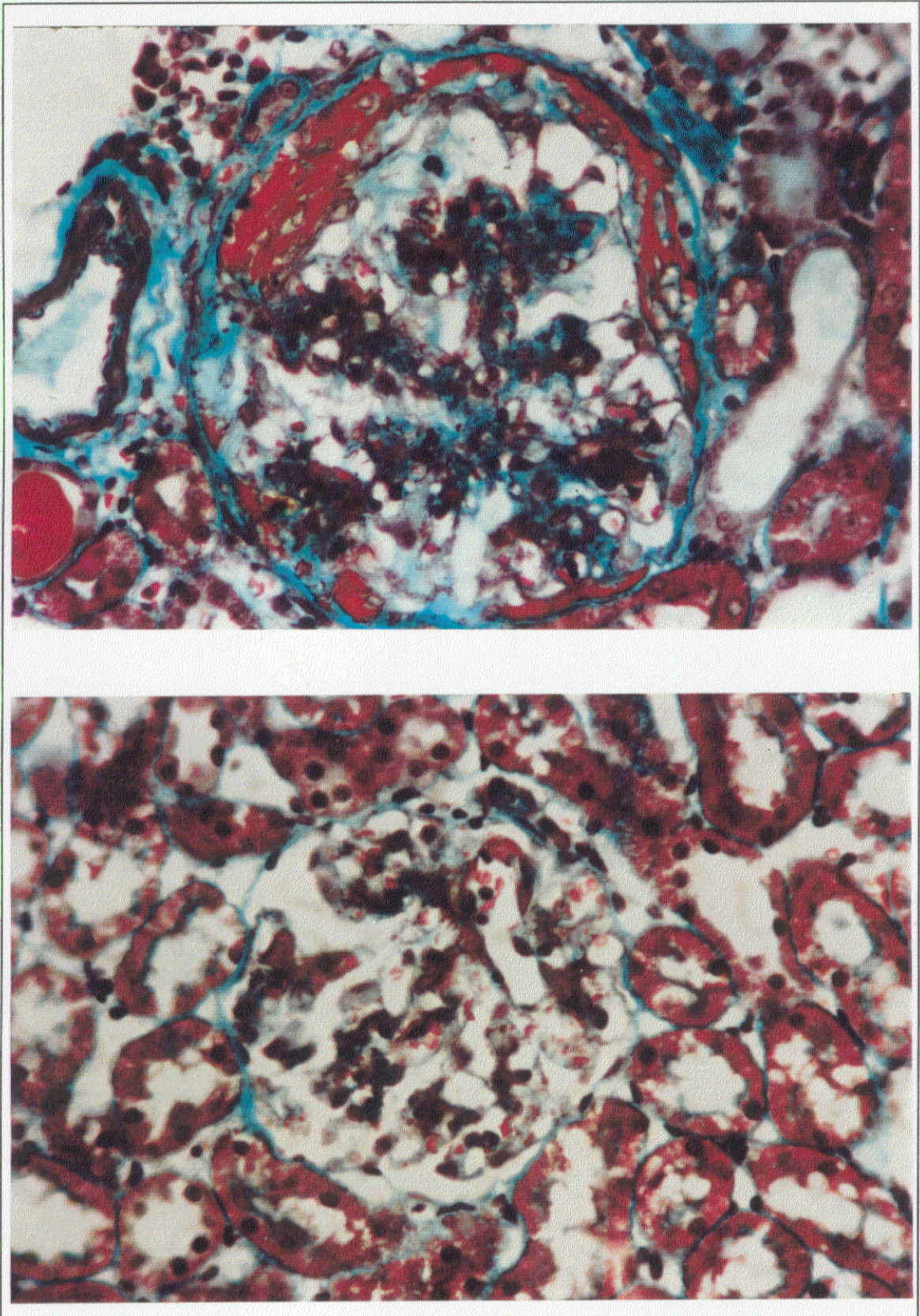
En las ratas con nefritis inmune no tratada las lesiones predominantes fueron la existencia de depósitos inmunes en el glomérulo y la infiltración por células inflamatorias (figura 20). Las paredes capilares glomerulares eran gruesas e irregulares, con aspecto de "asa de alambre". La hiper celularidad mesangial aumentó con la gravedad de la nefritis, observándose además una expansión del área mesangial. Algunos animales tenían incluso pequeñas semilunas adheridas a la cápsula de Bowman (figura 21). A nivel túbulointersticial se observó un aplanamiento de las células tubulares, con dilatación tubular y presencia de material protéico en el interior de la luz. También existió un infiltrado intersticial (figura 22). El aumento en la esclerosis glomerular se correlacionó con la proteinuria. Igualmente se observó una correlación lineal positiva entre el infiltrado intersticial, la atrofia tubular y la proteinuria ( $r^2=0.98$ ,  $p<0.005$ ).

El tratamiento con quinapril indujo una disminución de la proliferación celular glomerular, de la expansión del área mensagial, de la glomerulosclerosis, de la atrofia túbulointersticial y del infiltrado celular (figuras 20, 21 y 22).



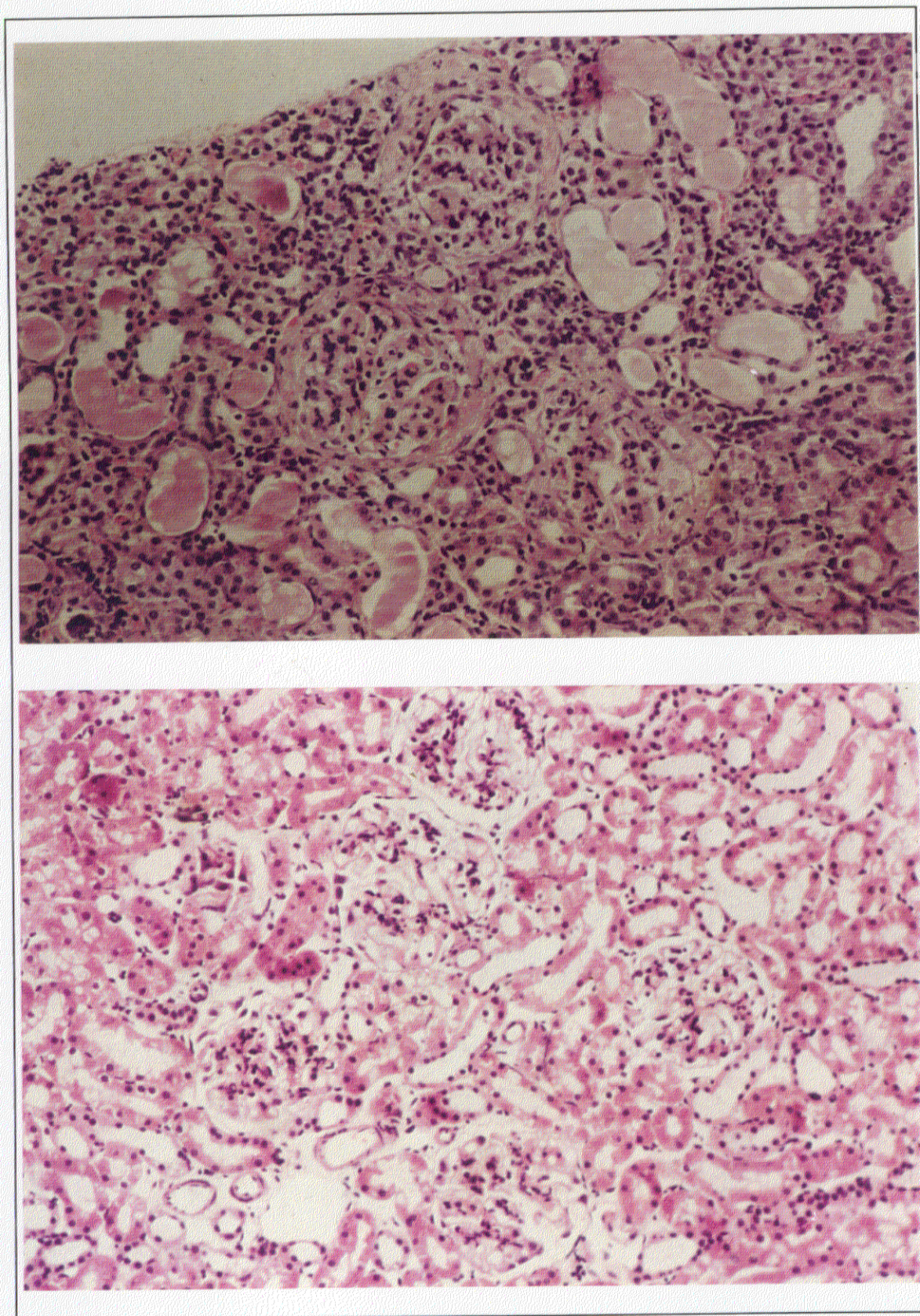
**Figura 20:** Análisis semicuantitativo del daño glomerular y tubulointersticial en ratas con nefritis. Las barras representan la valoración semicuantitativa de animales no tratados (blanco), o tratados con quinapril (rayado), expresado como media  $\pm$  EEM,  $n=6$  por grupo, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.05$  vs nefritis no tratada. Los resultados del grupo control sano no están incluidos al no encontrar diferencias en respuesta al tratamiento.





**Figura 21.** *Efecto del tratamiento con quinapril en el daño glomerular. (Arriba)* Microfotografía del glomérulo de una rata con nefritis teñido con tricrómico de Masson. Se observó expansión del área mesangial, proliferación celular y pequeñas semilunas adheridas a la cápsula de Bowman. *(Abajo)* En contraste, el glomérulo de una rata con nefritis tratada con quinapril muestra un discreto aumento del mesangio. Magnificación x600.



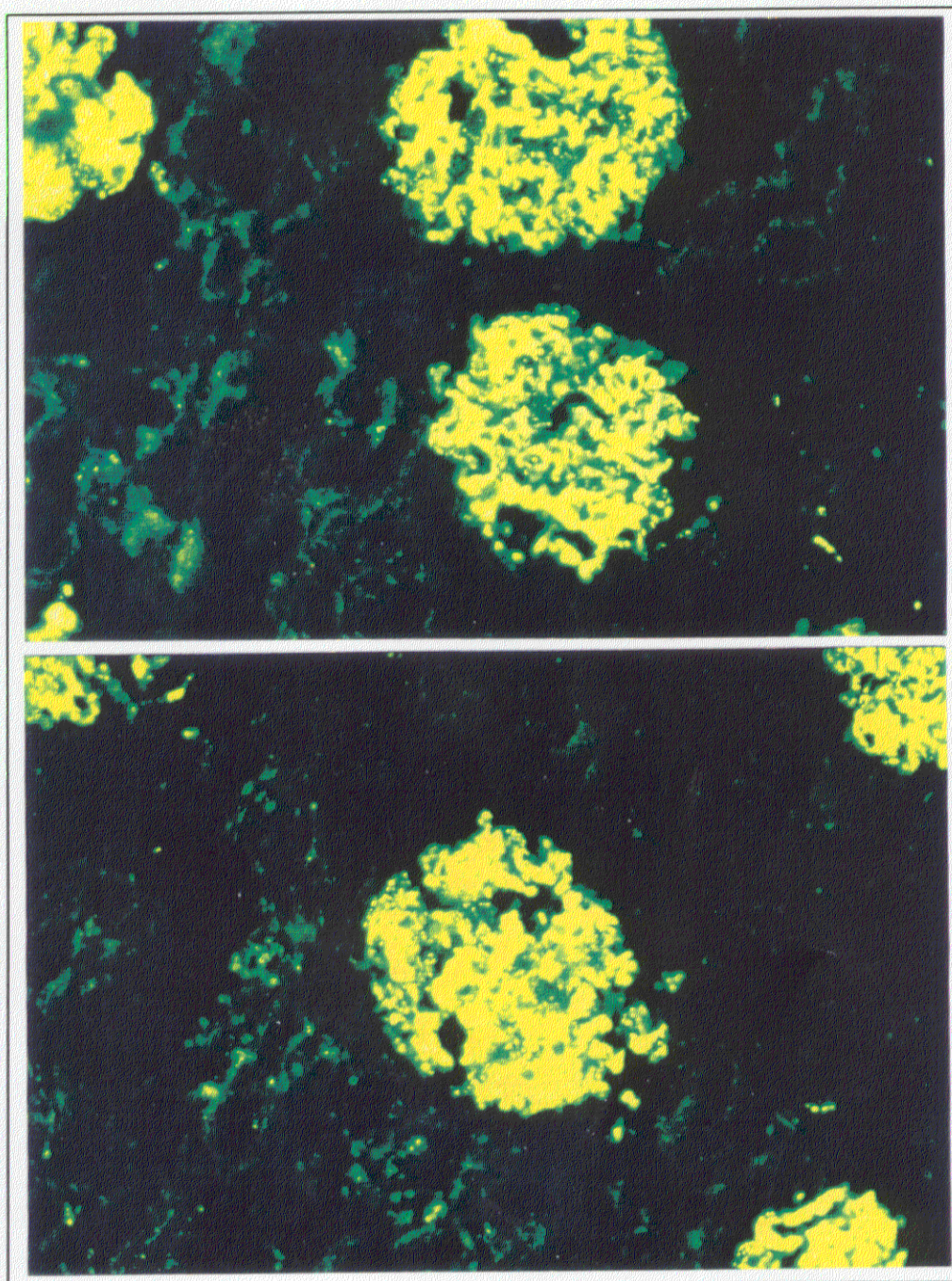


**Figura 22.** Efecto del tratamiento con quinapril en el daño tubulointersticial. (Arriba) Microfotografía del riñón de una rata con nefritis no tratada teñida con hematoxilina eosina. Se observa un intenso aplanamiento de las células tubulares, con dilatación de su luz y presencia de cilindros proteicos. Además, presenta un aumento del infiltrado mononuclear en el intersticio. (Abajo). Morfología prácticamente normal del área tubulointersticial de una rata tratada con quinapril. Magnificación x100.



### 1.3.2. Localización de los depósitos inmunes

Esta nefritis se caracteriza por presentar depósitos inmunes en todas las áreas glomerulares (Sánchez-Crespo et al., 1982). El tratamiento con quinapril redujo ligeramente los depósitos inmunes. No obstante, los depósitos se seguían observando en el mesangio y en la pared capilar ( $2.0 \pm 0.6$  nefritis-quinapril vs  $2.33 \pm 0.4$  nefritis no tratada; microscopía óptica, puntuación semicuantitativa;  $p = \text{n.s.}$ ). Los estudios de inmunofluorescencia mostraron que no existía cambio en la localización ni en la intensidad de los depósitos de IgG (figura 23).



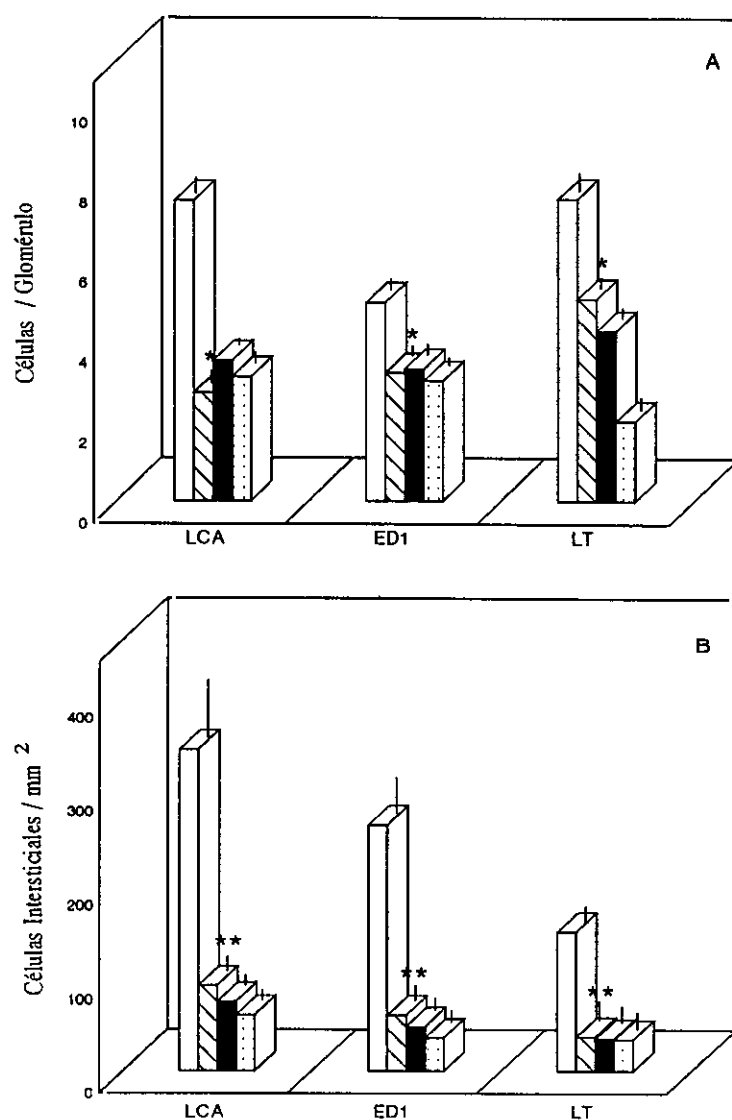
**Figura 23.** Localización de los depósitos inmunes por inmunofluorescencia. (Arriba) Glomérulo de una rata con nefritis no tratada mostrando depósitos de IgG en el área mesangial y en la pared capilar glomerular. (Abajo) No hay variación en la localización de los depósitos inmunes en respuesta al tratamiento con quinapril.



### 1.3.3. Infiltrado inflamatorio

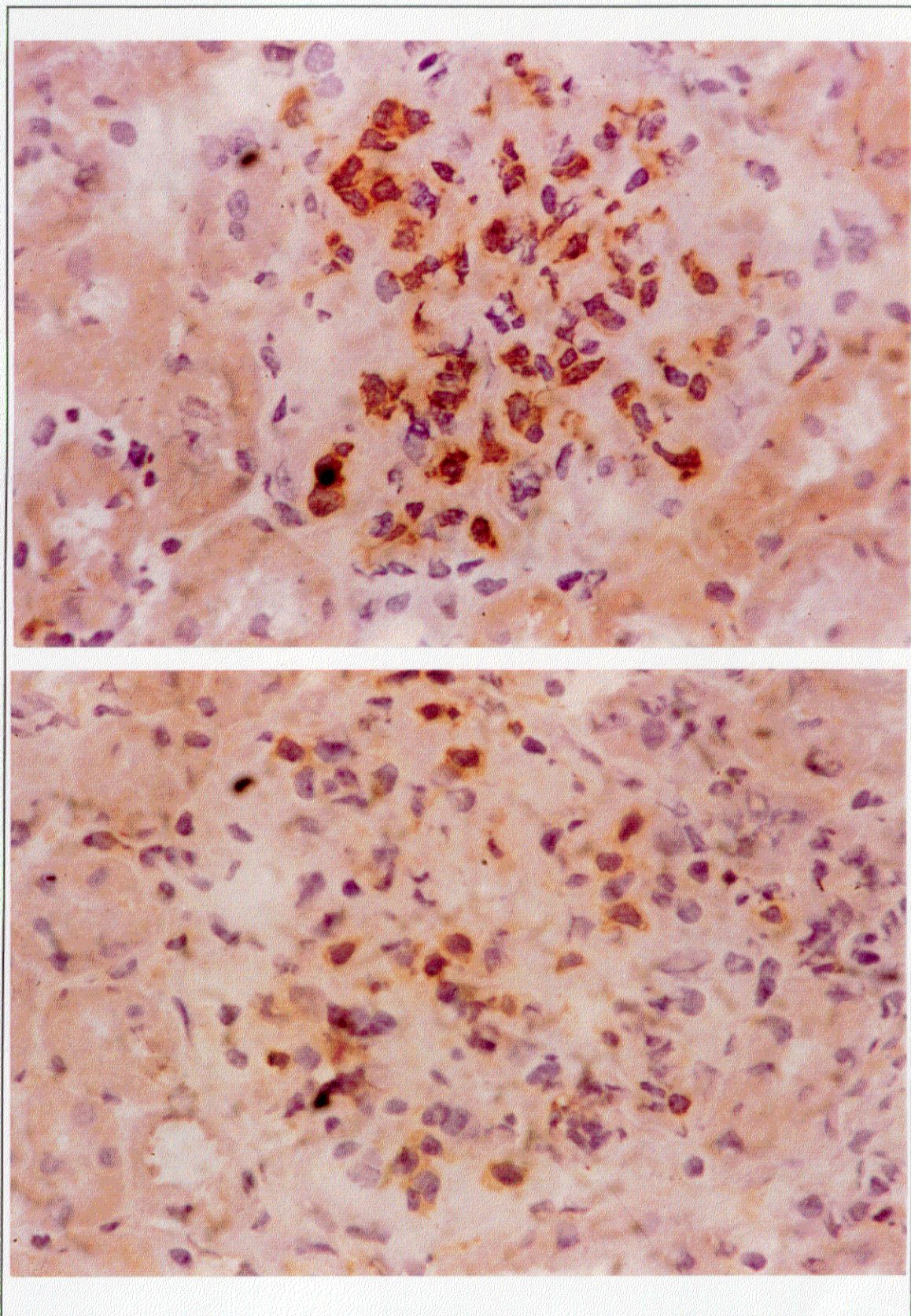
Hemos estudiado el fenotipo del infiltrado inflamatorio mediante el empleo de anticuerpos monoclonales y la técnica de inmunoperoxidasa indirecta. A nivel glomerular, las ratas con nefritis tratada con quinapril, en relación a las ratas con nefritis no tratada, presentaron menos leucocitos totales (LCA) ( $2.7 \pm 0.9$  nefritis-quinapril vs  $7.5 \pm 0.4$  nefritis no tratada, células/glomérulo), linfocitos T ( $3.2 \pm 0.7$  vs  $5.0 \pm 1.1$ ) y monocitos/macrófagos ( $5.1 \pm 1.9$  vs  $7.6 \pm 0.1$ ) (figuras 24 y 25).

El efecto del quinapril en el infiltrado intersticial fue más marcado, con una importante reducción en leucocitos totales ( $91 \pm 14$  nefritis-quinapril vs  $343 \pm 180$  nefritis no tratada, células/mm<sup>2</sup>), linfocitos T ( $60 \pm 9$  vs  $262 \pm 45$ ) y macrófagos ( $37 \pm 8$  vs  $149 \pm 14$ ) con valores próximos a los de las ratas sanas (figura 24B).



**Figura 24.** Caracterización del fenotipo del infiltrado inflamatorio glomerular (A) e intersticial (B) en la nefritis mediante inmunohistoquímica. El infiltrado se caracterizó mediante el empleo de anticuerpos monoclonales. Existió una reducción significativa en leucocitos totales (LCA), linfocitos T (LT) y monocitos/macrófagos (ED1) con respecto a la nefritis no tratada. Las barras representan nefritis no tratada (blanco), tratada con quinapril (rayas), controles sanos (negro) y controles tratados con quinapril (puntos). Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 3-5 animales por grupo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  vs nefritis no tratada.





**Figura 25.** Efecto del quinapril sobre la infiltración glomerular por macrófagos. Microfotografías de secciones teñidas con inmunoperoxidasa. (Arriba) Intensa infiltración glomerular por macrófagos (células ED1+) en una rata con nefritis. (Abajo) Discreta presencia de macrófagos ocasionales en el glomérulo de un animal tratado con quinapril. Magnificación x400.



En resumen, los resultados presentados en el apartado 1 demuestran que la administración del iECA quinapril a ratas con nefritis ya establecida mejora la evolución clínica y morfológica de la enfermedad, sugiriendo la participación del RAS en la patogenia de este modelo de nefritis inmune no asociado a hipertensión.

## **2. ESTUDIO DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

Con el objeto de profundizar en el estudio de la participación del RAS en el daño renal en este modelo experimental normotensa de nefritis por inmunocomplejos abordamos la hipótesis de que alguno de los componentes de este sistema pudiera estar activado.

En primer lugar estudiamos la actividad de la ECA en las ratas con nefritis con el propósito de determinar si existía un aumento en la producción de AngII a nivel circulante o tisular. Además, determinamos si el efecto beneficioso del tratamiento con quinapril se podría atribuir a la inhibición tisular de la ECA. En segundo lugar, estudiamos la expresión génica a nivel renal de alguno de los componentes del RAS, en particular de la ECA, el angiotensinógeno y el receptor AT<sub>1</sub> de la AngII.

### **2.1. Estudio de la actividad de la enzima de conversión de la angiotensina**

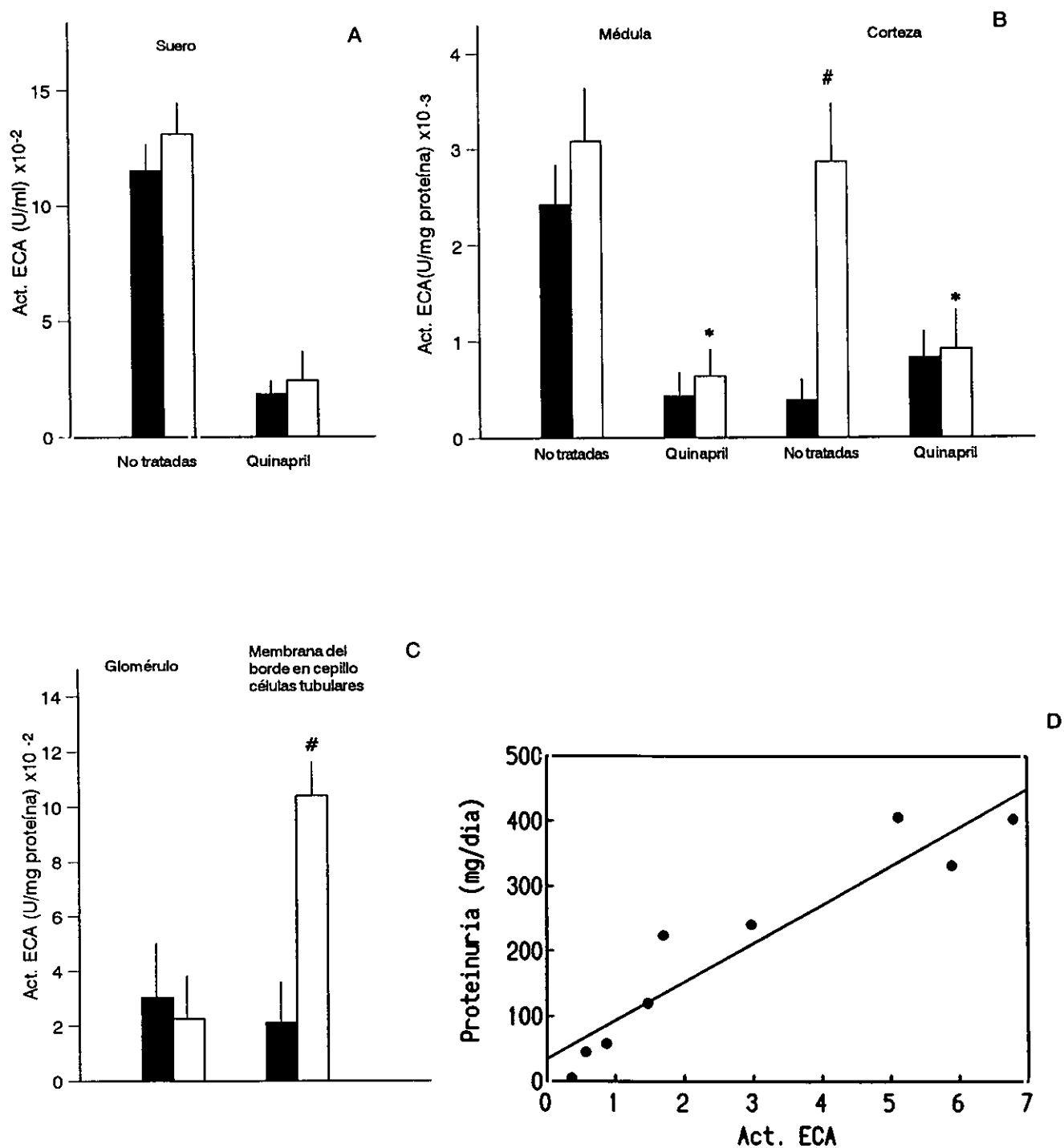
#### **2.1.1. Actividad en suero y en tejido renal**

En los animales con nefritis la actividad de la ECA en el tejido renal estuvo significativamente elevada con respecto los controles ( $9,8 \cdot 10^{-4}$  nefritis vs  $3,12 \cdot 10^{-4}$  control, U/mg proteína,  $p < 0.005$ ,  $n = 12$ ). Por el contrario, no se observaron diferencias en la actividad de la ECA en el suero ( $0,147$  nefritis vs  $0,127$  control U/ml) (figura 26A). Estos resultados demuestran un diferente comportamiento entre el RAS circulante y tisular en este modelo.

#### **2.1.2. Localización de la actividad en el tejido renal**

Las ratas con nefritis inmune presentan un aumento en la actividad de la ECA en la corteza y en la médula renal (figura 26B), aunque en esta última no alcanzó significación estadística. El aumento en la actividad de la ECA en la corteza renal se correlacionó con la proteinuria (figura 26D), observándose ya incluso en la fase moderada un aumento en la actividad de esta enzima (proteinuria de 50 mg/día incremento de  $x$ -veces vs control sano).

Posteriormente, determinamos la localización de la ECA en los animales con nefritis estudiando su actividad en el glomérulo y en la membrana del borde en cepillo de las células epiteliales tubulares. Como muestra la figura 26, en las ratas con nefritis no se observaron diferencias en la actividad de la ECA glomerular con respecto a los controles sanos. Por el contrario, la actividad de la ECA localizada en la membrana del borde en cepillo de las células epiteliales tubulares, donde presenta una actividad de alrededor de 100 veces superior al homogeneizado de corteza del que procede, estaba elevada con respecto a los controles.



**Figura 26.** Actividad de la ECA en suero (A) y en tejido renal (B) en los distintos grupos estudiados. (C) Localización del aumento de la actividad de la ECA en las ratas con nefritis. La actividad de la ECA se determinó mediante un ensayo colorimétrico según se describe en "Métodos". Las barras representan la media  $\pm$  EEM de control (negro) y nefritis (blanco).  $n=5-6$  por grupo, \* $p < 0.05$ , vs nefritis no tratada, # $p < 0.05$  vs control. (D) Correlación entre la actividad de la ECA en la corteza renal y la proteinuria.

Estos resultados demuestran que las ratas con nefritis presentan un aumento en la actividad de la ECA en la corteza renal, localizado fundamentalmente en las células epiteliales tubulares, lo que sugiere un incremento en la producción local de AngII. Esta mayor concentración tisular de AngII podría ser uno de los factores implicados en el desarrollo del daño renal en este modelo.

### 2.1.3. Efecto del tratamiento con iECA

La administración del iECA quinapril inhibió la actividad de la ECA en suero un 96% en los animales con nefritis tratada (figura 26A). La actividad de la ECA tisular en la corteza y en la médula renal disminuyó en un 68 y 79%, respectivamente (figura 26B). Este resultado sugiere que el efecto beneficioso del quinapril puede ser debido a la inhibición de la generación local de AngII, bloqueando, por tanto, sus efectos sobre las células renales.

Resultados similares de inhibición de la ECA, sérica y tisular, fueron observados en los controles tratados con quinapril (figura 26A y B).

## **2.2. Regulación génica de los componentes del RAS en tejido renal**

### 2.2.1. Expresión de la ECA

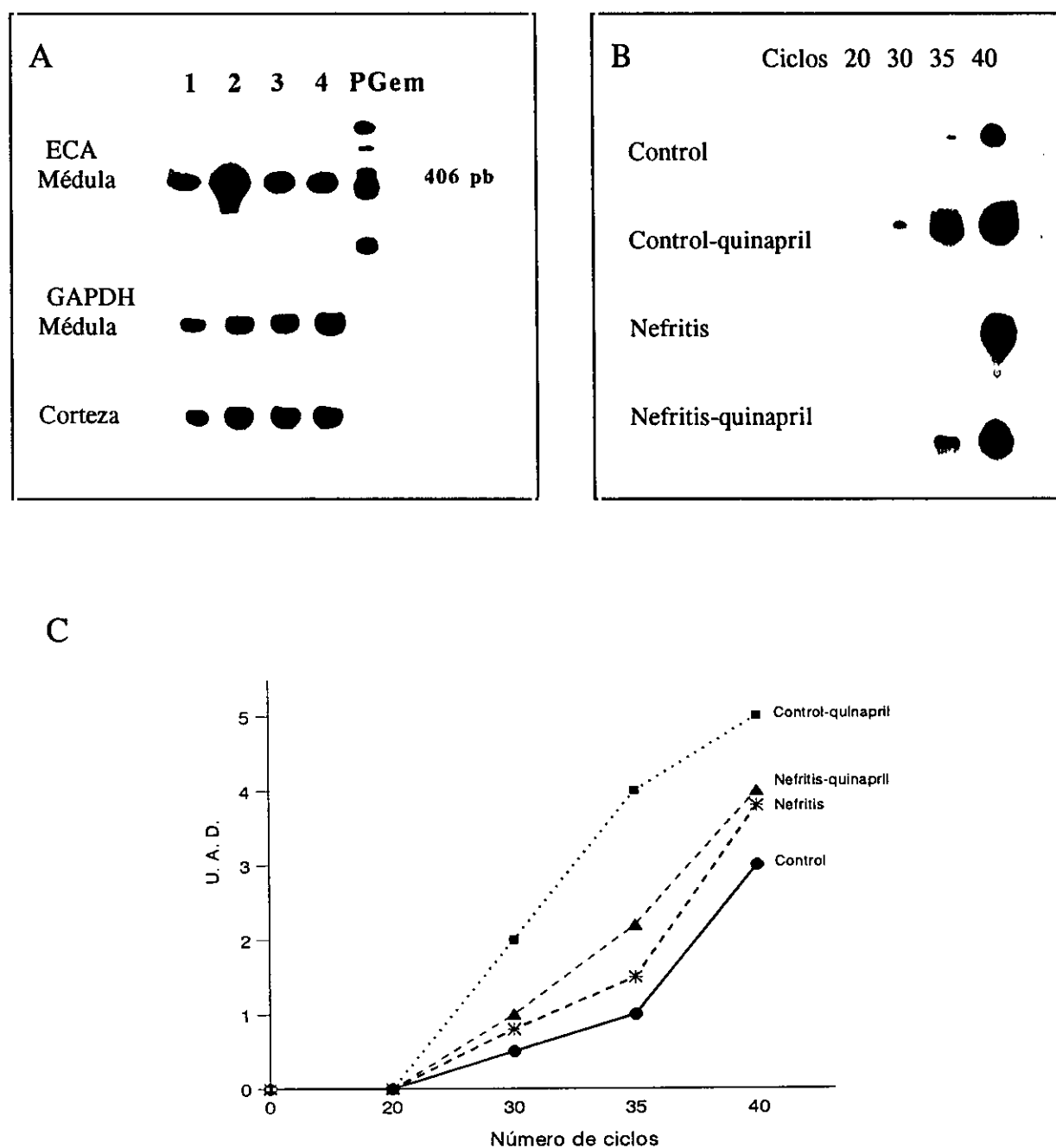
Hemos determinado la expresión del mRNA de la ECA mediante la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR) relacionando los valores obtenidos con la señal de la G3PDH de cada muestra con la misma reacción de la transcriptasa inversa. En las ratas con nefritis observamos mediante el análisis de la corteza renal un ligero aumento la expresión del mRNA de la ECA (1.5-veces), con respecto a los controles. Por el contrario, no se modificó su expresión en la médula (figura 27).

La inhibición de la ECA provocó un aumento en su expresión génica en la corteza y en la médula (alrededor de 3 veces) (figura 27). En las ratas con nefritis, la administración de quinapril incrementó la expresión del mRNA de la ECA en la corteza, mientras que en la médula presentó valores similares a los controles (figura 27).

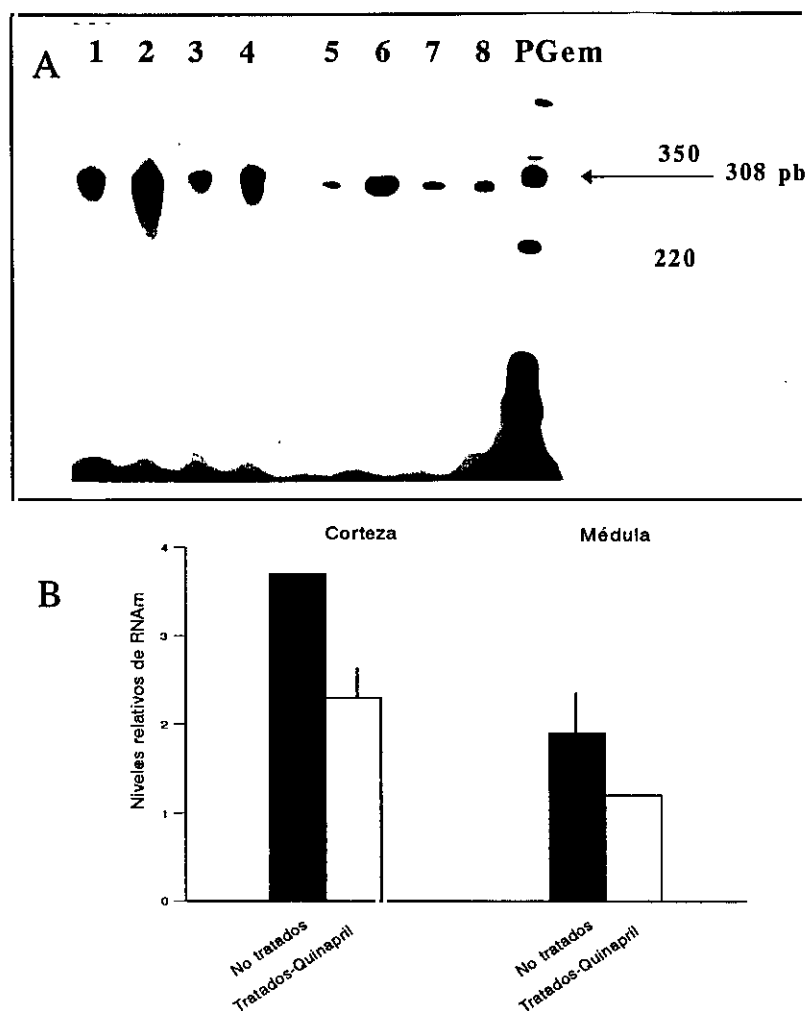
### 2.2.2. Expresión del angiotensinógeno

Mediante estudios de RT-PCR, observamos en las ratas con nefritis un aumento en la expresión del mRNA del Ao en la corteza y en la médula renal (2- y 3 -veces, respectivamente) en relación a los controles (figura 28). En las ratas con nefritis tratada con quinapril, observamos una disminución en la expresión génica del Ao respecto a las no tratadas (figura 28). En respuesta al tratamiento con quinapril en los animales control no se observaron variaciones en la expresión renal del Ao (figura 28).





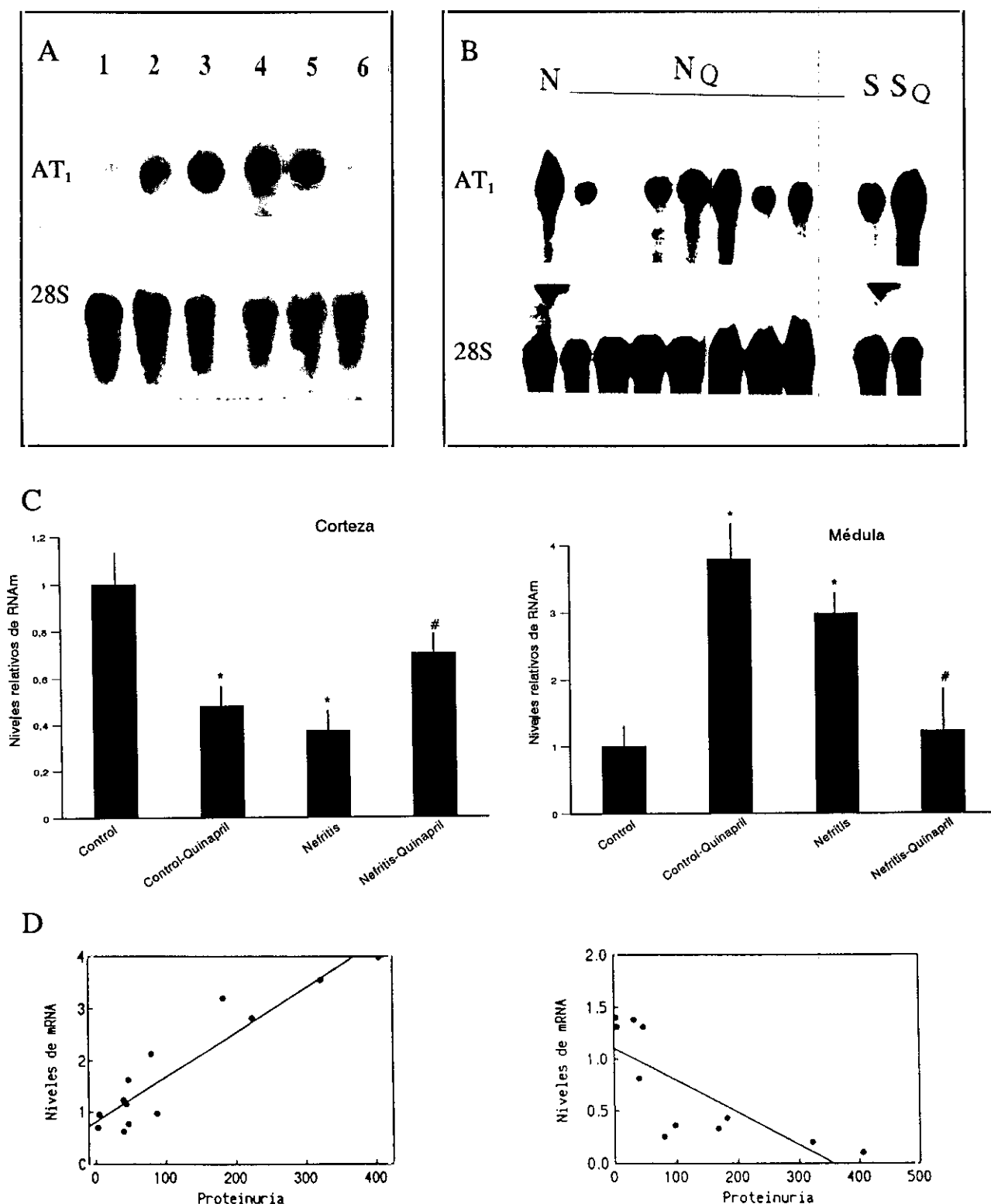
**Figura 27.** *Expresión génica de la ECA.* Los animales fueron mezclados (4-6 por grupo) y se realizaron 3 reacciones de RT de 2  $\mu$ g de RNA cada una. Una cuarta parte de la reacción de RT se empleó para un análisis de PCR. (A) Autorradiografía representativa del análisis por RT-PCR de la ECA y de la G3PDH en la médula renal. Línea 1 (controles sanos), línea 2 (controles tratados con quinapril), línea 3 (nefritis no tratada), línea 4 (nefritis tratada con quinapril). La posición de los productos de PCR está indicada a la derecha. Ciclos del análisis de RT-PCR de la ECA en la corteza renal (B) autorradiografía y (C) análisis densitométrico.



### 2.2.3. Expresión del receptor AT<sub>1</sub>

Mediante análisis por Northern blot hemos determinado la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub> de la AngII. En las ratas con nefritis se observó una redistribución de la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub> en tejido renal, presentaron un aumento en su expresión génica en la corteza y una disminución en la médula (figura 29A). En las ratas sanas tratadas con quinapril se observó un aumento en la expresión del mRNA del AT<sub>1</sub> en la corteza y una disminución en la médula (figura 29A). En las ratas con nefritis, en respuesta al tratamiento con quinapril, la expresión del receptor AT<sub>1</sub> en la médula se modificó existiendo una tendencia hacia los valores de ratas sanas sin tratamiento (figura 29B). Además, existió una correlación entre los valores de la expresión del receptor y la proteinuria ( $r=0.9$ ,  $p<0.001$ ) (figura 29C). Por el contrario, en la corteza renal no existió una respuesta homogénea al tratamiento con quinapril (figura 29D).

En resumen, los resultados presentados en el apartado 2 demuestran una redistribución y activación del RAS tisular en una situación de daño renal no asociado a hipertensión. El aumento observado en la actividad de la ECA en tejido renal sugiere que la AngII generada localmente podría participar en el desarrollo del daño renal. En respuesta al tratamiento con quinapril la actividad de ECA renal se inhibió un 60-80%, por ello el efecto beneficioso de este fármaco puede ser debido a la inhibición de la generación local de la AngII.



**Figura 29.** Expresión génica del receptor AT<sub>1</sub> en tejido renal. La figura (A) muestra un Northern blot de una mezcla de RNA total de 4 animales por grupo de la corteza (1 a 3) y de la médula (4 a 6) renal. Línea 1,4 (control), línea 2,5 (nefritis), línea 3,6 (control-quinapril). (B) Efecto del tratamiento con quinapril. La figura muestra la expresión del receptor AT<sub>1</sub> en la médula renal de varios animales con nefritis tratada con quinapril. (C) Análisis densitométrico. Los valores corregidos por el valor del 28S y expresados como n-veces de incremento respecto al control, media±DE de 4-6 animales por grupo, \*p<0.005 vs control. #p<0.05 vs nefritis. Correlación entre la expresión génica del receptor AT<sub>1</sub> en la médula renal (D) o en la corteza (E) y la proteinuria.

### 3. PROTEINAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

La expansión de la matriz extracelular es una de las características de las glomerulonefritis experimentales y humanas (Floege et al., 1991). La composición y distribución del aumento patológico de matriz varía de unas enfermedades a otras. En situaciones de daño renal asociadas con expansión y proliferación mesangial, suele estar aumentada el depósito de fibronectina y colágeno tipo IV (Hynes et al., 1990; Adler et al., 1986). Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que las ratas con nefritis inmune presentan un aumento en la expresión y síntesis glomerular de fibronectina y en el acúmulo de esta proteína a nivel glomerular (Ortiz et al., 1995).

#### 3.1. Estudio de proteínas de matriz extracelular mediante inmunohistoquímica

Mediante estudios de inmunofluorescencia se ha demostrado que en ratas sanas, la fibronectina está depositada en el área mesangial. El colágeno tipo IV se observa en la cápsula de Bowman, en los capilares peritubulares y en el mesangio. Los colágenos tipo I y III se encuentran en el área intersticial (Kaneto et al., 1994), apareciendo en la matriz mesangial sólo en condiciones patológicas.

En animales con nefritis, los estudios de inmunofluorescencia mostraron que la fibronectina y el colágeno tipo IV estaban aumentados en el mesangio con extensión a la pared capilar, y aparecieron en la membrana basal tubular y en el intersticio (figura 30A y C). Por el contrario, mediante el empleo de esta técnica no hemos observado diferencias en los colágenos intersticiales tipo I y III (datos no mostrados). En las ratas tratadas con quinapril se observó una disminución importante en el depósito glomerular de fibronectina y colágeno tipo IV (figura 30B y D).

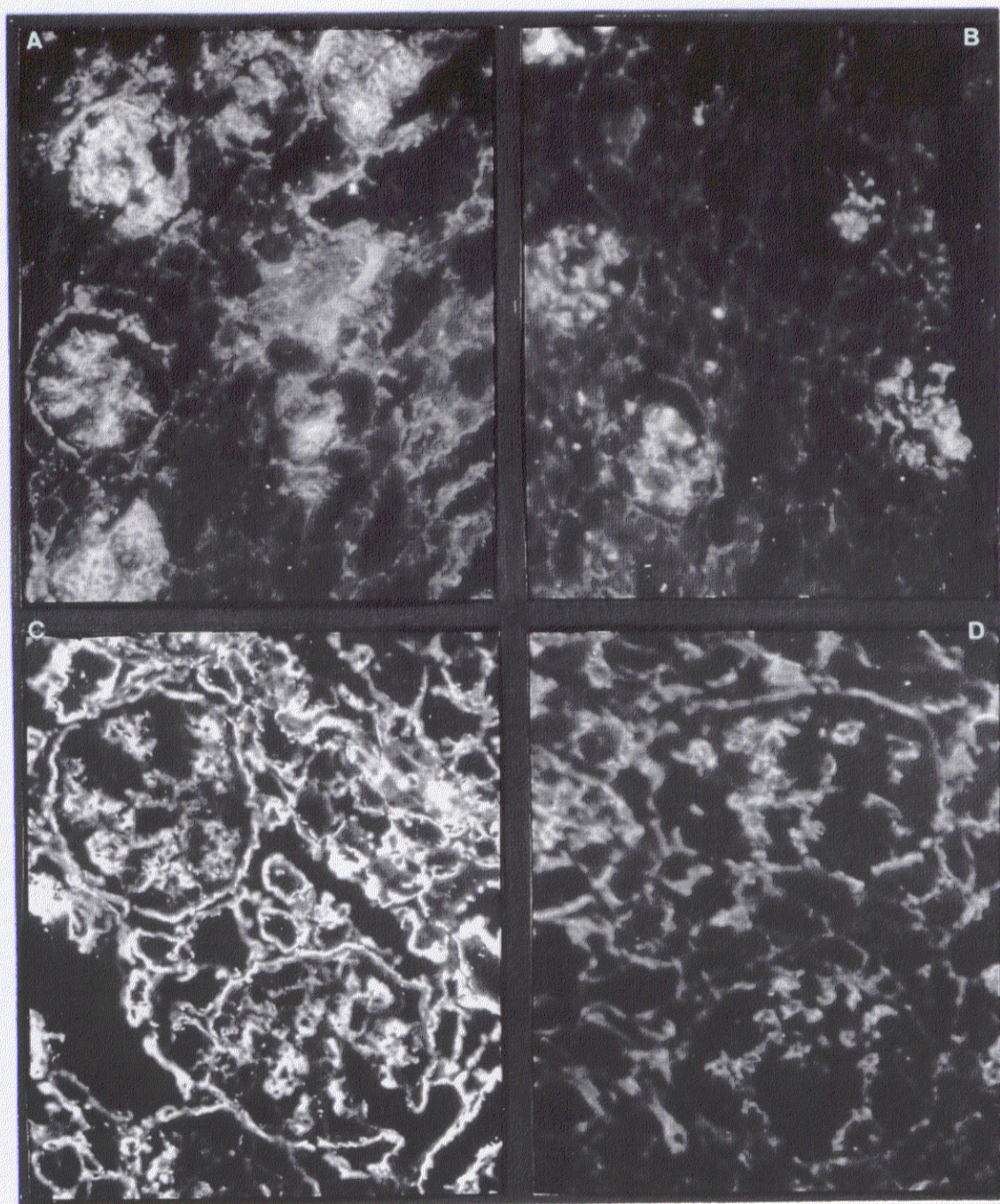
#### 3.2. Expresión de proteínas de matriz extracelular

El análisis mediante la técnica de dot blot de la expresión génica de proteínas de matriz extracelular en la corteza renal de las ratas con nefritis, mostró un incremento de 25 veces en la expresión del mRNA de la FN, y de 8 veces en el colágeno tipo IV, con respecto a las ratas sanas (figura 31). Los colágenos intersticiales, tipo I y III, también se encontraron aumentados aunque en menor medida (3,7 veces y 2,8 veces respectivamente) (figura 31).

Este incremento en la expresión de las proteínas de matriz en el riñón se correlacionó con los resultados obtenidos por inmunofluorescencia, indicando que el acúmulo de estas proteínas se debe a un aumento en la transcripción de sus genes, como ocurre en otras enfermedades renales (Kopp et al., 1993).

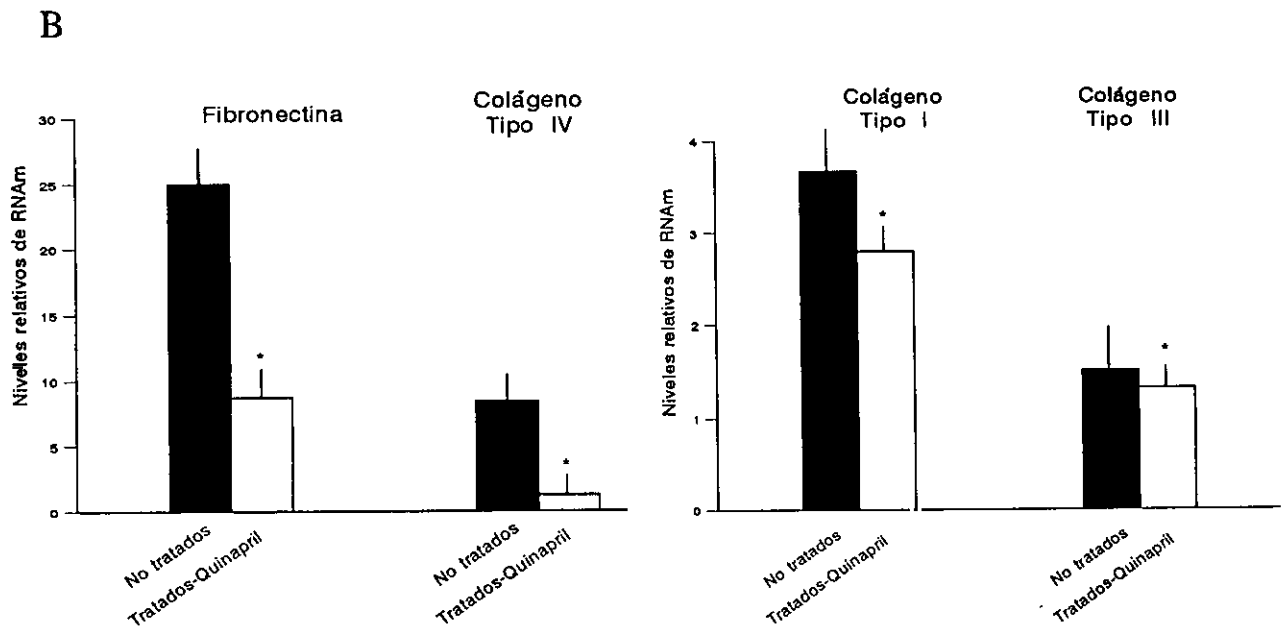
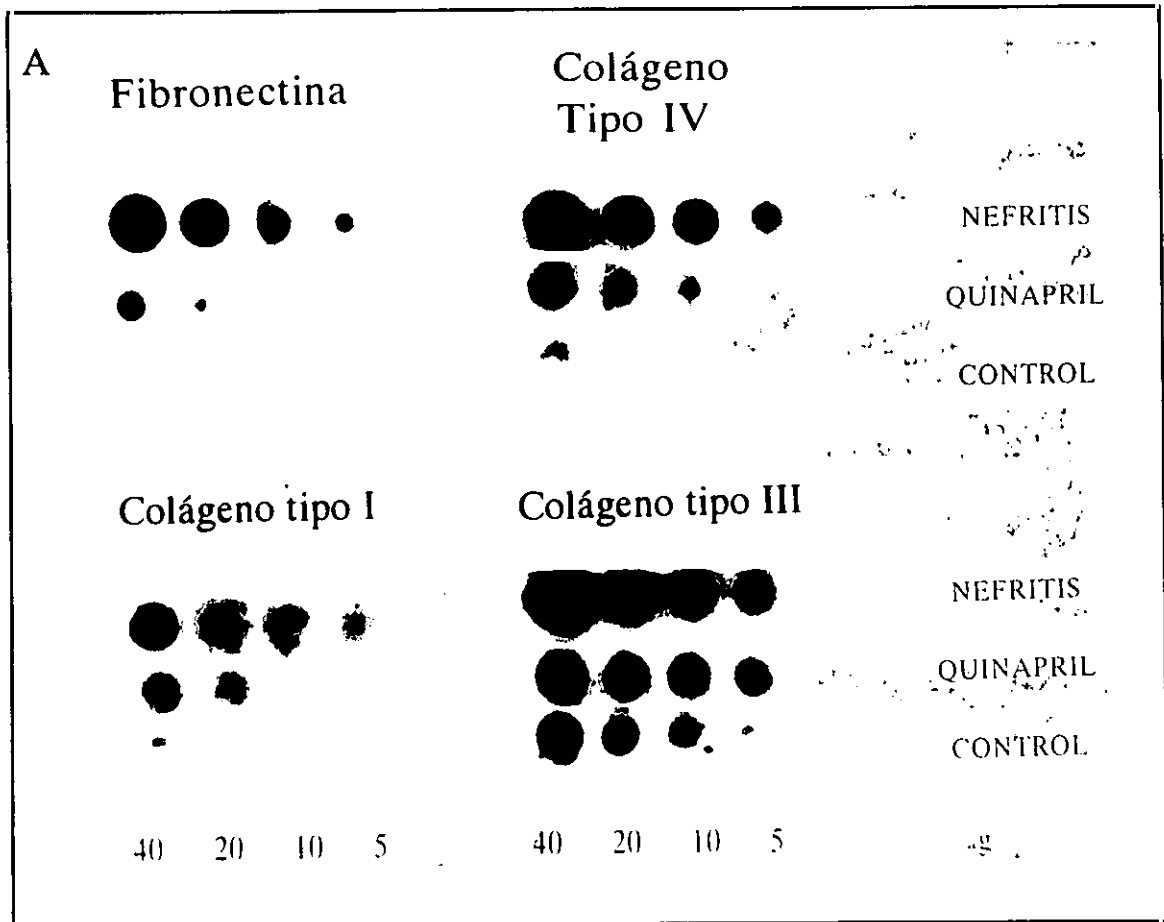
En las ratas tratadas con quinapril observamos una disminución de este incremento anormal de los componentes de la matriz extracelular (figura 31). El colágeno tipo IV presentó un descenso significativo (86% frente a la nefritis no tratada). La fibronectina también disminuyó en gran medida (65%), mientras que los colágenos intersticiales lo hicieron alrededor de un 40% (figura 31).





**Figura 30.** *Detección inmunohistoquímica de los componentes de la matriz extracelular.* Microfotografías de inmunofluorescencia de secciones de tejido renal. Observen la intensa tinción frente a fibronectina en el glomérulo de las ratas con nefritis (A) que disminuye en las tratadas con quinapril (B). En las ratas con nefritis, el colágeno tipo IV se encuentra a lo largo de la membrana basal glomerular, en la matriz mesangial, así como en la membrana basal de la cápsula de Bowman y en el túbulo, casi en iguales cantidades (C). Se observa un aumento en el depósito de colágeno tipo IV en la matriz mesangial glomerular, que disminuye en las ratas tratadas con quinapril (D).





**Figura 31. Expresión génica de las proteínas de matriz en la corteza renal. (A) Análisis de dot blot.** Diluciones seriadas de RNA total de cada rata fueron hibridadas con las sondas de cDNA para fibronectina y colágenos tipo I, III y IV. La figura muestra un resultado representativo de un animal de cada grupo. **(B) Análisis densitométrico.** Los valores fueron obtenidos de la segunda dilución (20 µg de RNA), corregidos por el 28S y expresados como n-veces de incremento respecto al control, representan la media ± DE de 4-6 animales por grupo, \*p < 0.005 vs nefritis.

#### 4. CITOQUINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Los mecanismos moleculares que ocurren en respuesta al daño renal y que dan lugar a la fibrosis renal son desconocidos. Diversas citoquinas, sintetizadas por las células residentes e infiltrantes, regulan el proceso del acumulo de matriz en el riñón dañado (ver página 3, tabla 1). Por ello, en primer lugar determinamos si en las ratas con nefritis inmune estaba aumentada la expresión génica en tejido renal de estos factores, estudiando en concreto factores relacionados con la proliferación celular y la regulación de la matriz extracelular, como el TGF- $\beta$  y la preproET-1, y con el reclutamiento celular, como el MCP-1.

En segundo lugar, con el propósito de elucidar los mecanismos del efecto beneficioso de la inhibición de la ECA, determinamos si el tratamiento con un iECA, quinapril, modula la expresión renal de alguno de estos factores.

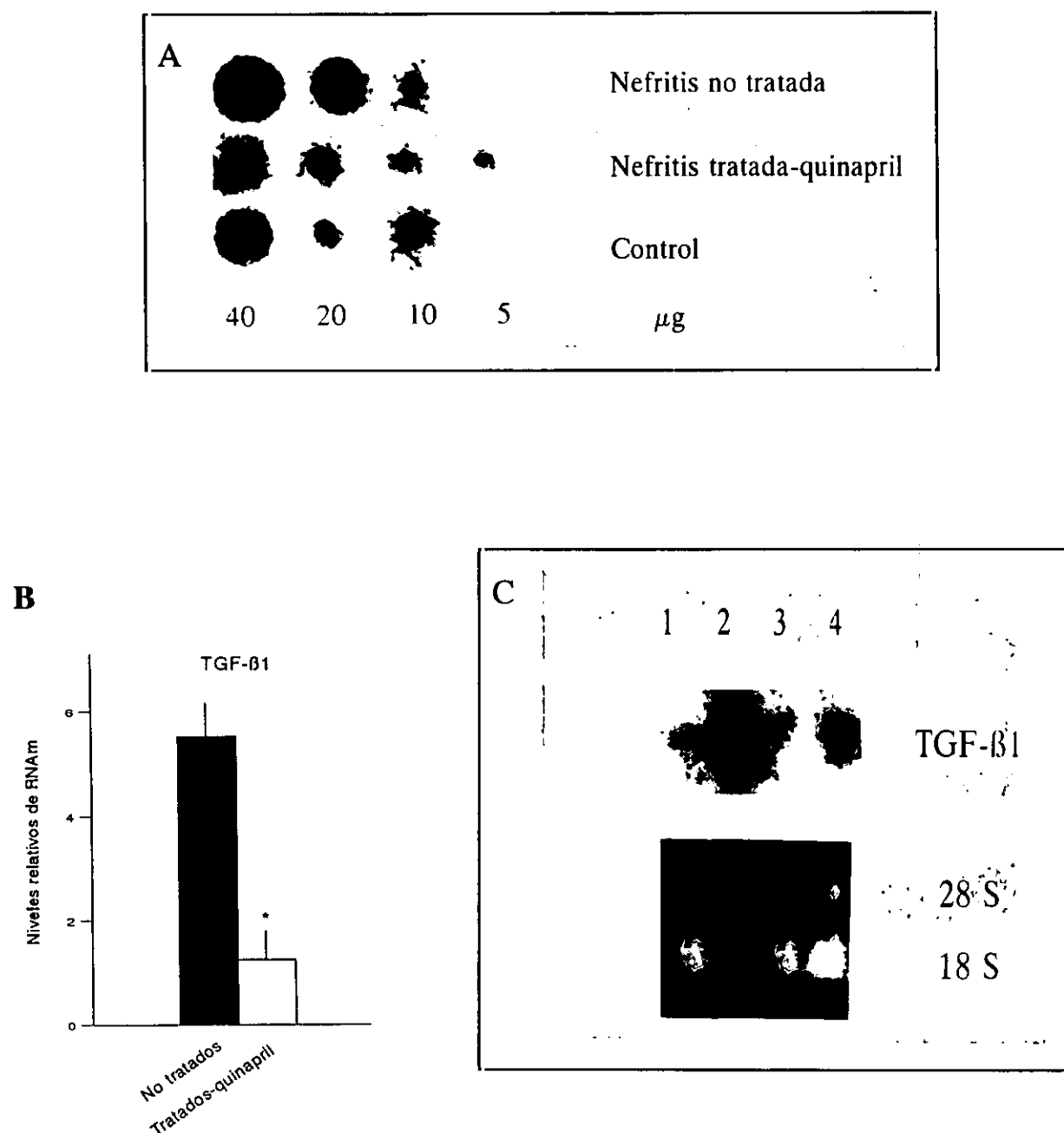
##### 4.1. Expresión renal del TGF- $\beta$ 1.

En nefritis experimentales se ha descrito una estrecha asociación entre una elevada expresión del mRNA del TGF- $\beta$ 1 y el desarrollo del daño glomerular (Okuda et al., 1990). Además, se ha demostrado que la transfección *in vivo* del gen del TGF- $\beta$  provoca glomeruloesclerosis (Isaka et al., 1994).

Mediante análisis por Northern blot se observó en la corteza renal de ratas sanas una ligera banda de 2,5 Kb correspondiente a la expresión del mRNA del TGF- $\beta$ 1 (figura 32C), sugiriendo un bajo nivel de expresión de este factor de crecimiento en la corteza.

En las ratas con nefritis, se observó un marcado aumento en el mRNA del TGF- $\beta$ 1 en la corteza renal (5 veces). Por el contrario, no se observó un aumento a nivel de la médula (resultados no mostrados). El análisis por dot blot mostró resultados similares (figura 32A y B). El tratamiento con quinapril disminuyó la expresión del TGF- $\beta$ 1 en la corteza renal (figura 32).

Este resultado sugiere que el efecto beneficioso del tratamiento con un iECA observado en la síntesis de proteínas de matriz podría ser debido a la disminución en la expresión del mRNA del TGF- $\beta$ .



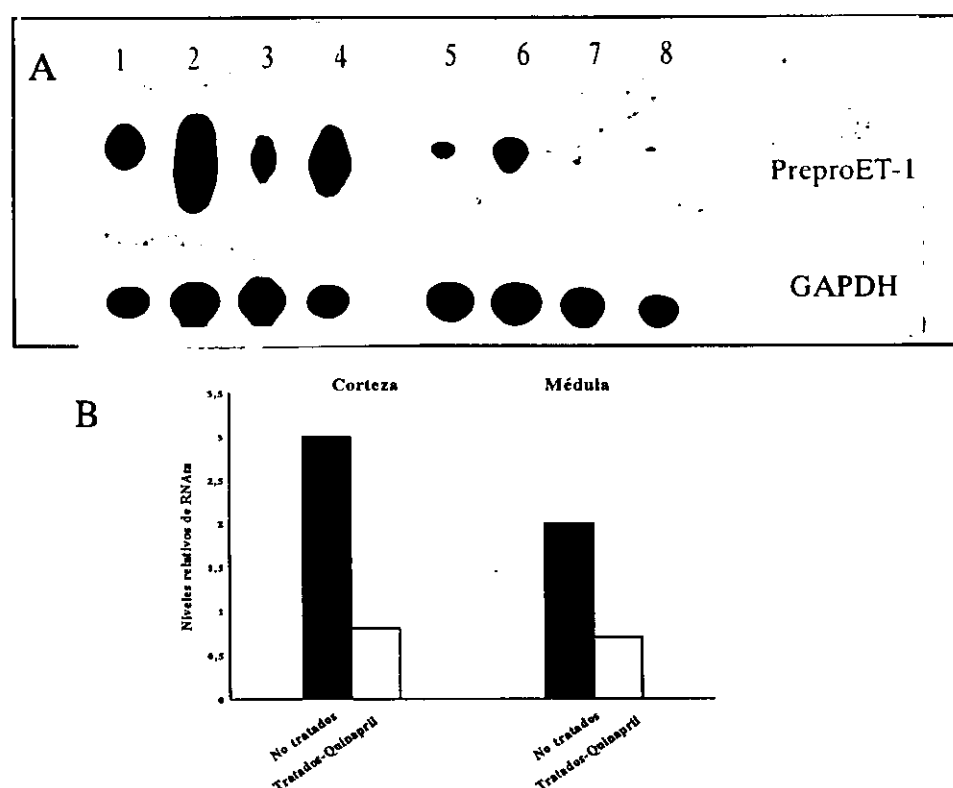
**Figura 32.** Expresión génica del mRNA del TGF- $\beta$ 1 en la corteza renal. (A) Análisis de dot blot. Diluciones seriadas de RNA de cada rata fueron hibridadas con la sonda del TGF- $\beta$ 1. La figura muestra un resultado representativo de un animal de cada grupo. (B) Análisis densitométrico. Los valores fueron obtenidos de la segunda dilución (20  $\mu\text{g}$  de RNA) corregidos por el 28S y expresados como n-veces de incremento respecto al control, media  $\pm$  DE de 4-6 animales por grupo, \* $p < 0.005$  vs nefritis. (C) Northern-blot. Los animales fueron mezclados (4 por grupo) y se cargaron 30  $\mu\text{g}$  de RNA. La calidad y cantidad de RNA cargada en cada pocillo fue comprobada por tinción con bromuro de etidio. Línea 1 (control), línea 2 (nefritis), línea 3 (control-quinapril), línea 4 (nefritis-quinapril).



#### 4.2. Expresión renal de la preproET-1

La participación de la endotelina en el daño renal se ha demostrado en diferentes modelos de daño renal. Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que en este modelo de nefritis inmune existe un aumento en la expresión renal de la preproET-1 y en la excreción urinaria de ET-1 en las ratas con nefritis (Gómez-Garre et al., 1995).

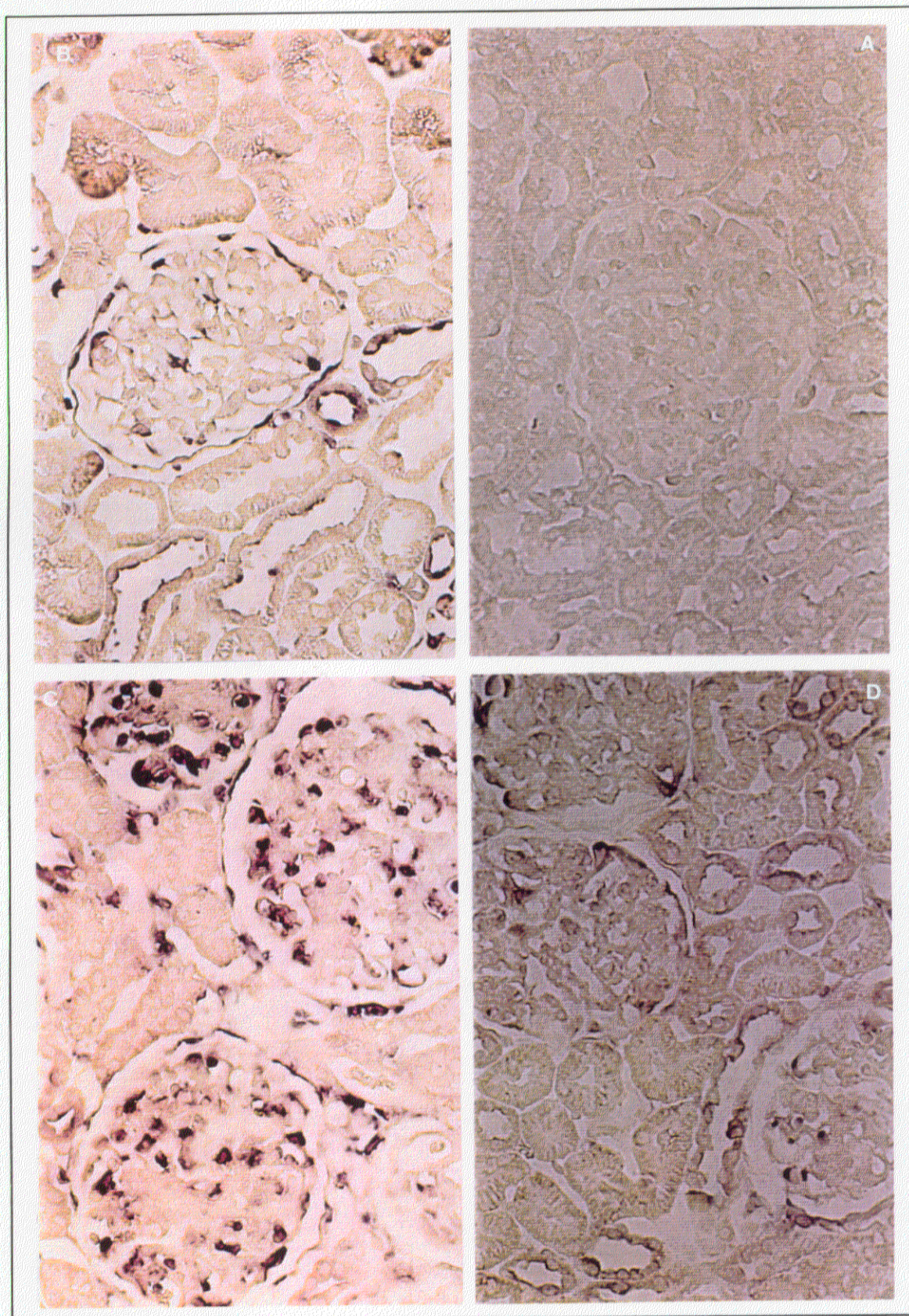
Mediante estudios de RT-PCR hemos observado en las ratas con nefritis no tratada un aumento en la expresión del mRNA de la preproET-1 con respecto a los controles sanos. Este incremento fue mayor en la corteza que en la médula renal (3 y 2 veces). En respuesta al tratamiento con quinapril la expresión génica de la preproET-1 disminuyó hasta los niveles de ratas sanas (figura 33).



**Figura 33.** Expresión génica del mRNA de la preproendotelina en tejido renal. La figura (A) muestra una autorradiografía representativa del análisis por RT-PCR de la corteza (1-4) y de la médula (5-8). Línea 1,5 (control), línea 2,6 (nefritis), línea 3,7 (control-quinapril), línea 4,8 (nefritis-quinapril). (B) Análisis densitométrico de los resultados corregidos por el valor de la GAPDH y expresados como n-veces de incremento respecto al control, media  $\pm$  DE de 3 experimentos de RT-PCR con mezclas de RNA total de 4-6 animales por grupo.

Mediante hibridación *in situ*, se estudió la distribución celular del mRNA de la preproET-1 en el tejido renal. En ratas sanas, la ET se expresa en glomérulos (localizada en los capilares glomerulares, células mesangiales y en las epiteliales) y en el polo luminal de algunas células epiteliales tubulares. En las ratas con nefritis inmune se observa un aumento en la expresión génica de la preproET-1 en estas zonas. Hemos observado que la administración de quinapril disminuyó la expresión del mRNA de la preproET-1 en todas las estructuras renales (figura 34).





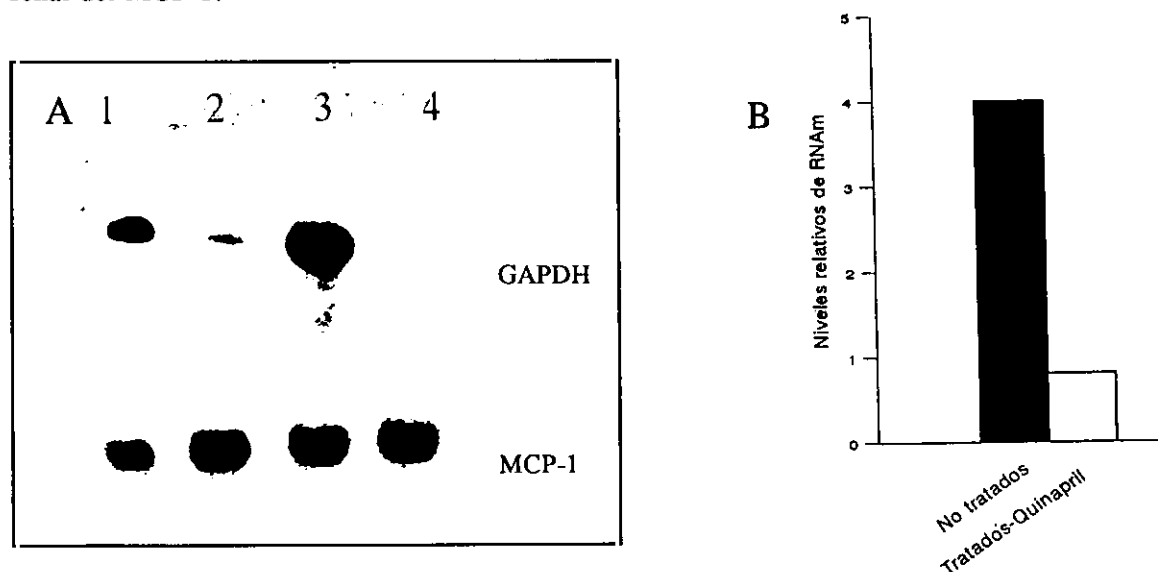
**Figura 34.** Localización de la expresión de la *preproET-1* por hibridación *in situ*. (A) Ausencia de marcaje en tejido renal hibridado con la sonda sentido de la *preproET-1*. La sonda antisentido de la *preproET-1* marcada con digoxigenina fue hibridada con secciones de tejido renal de (B) rata control (C) nefritis no tratada y (D) nefritis tratada con quinapril.



#### 4.3. Expresión renal del MCP-1

Entre las sustancias implicadas en el reclutamiento de monocitos cabe destacar el MCP-1 (scholdorff et al., 1995; Nikolic-Patterson et al., 1994). Recientemente se ha demostrado un aumento en su expresión glomerular en un modelo de glomerulonefritis mesangial inducido por anticuerpos anti-Thy1.1 sugiriendo su participación en el daño renal (Stahl et al., 1993).

Mediante estudios de RT-PCR, hemos observado en las ratas con nefritis un aumento de 4 veces en la expresión del mRNA del MCP-1 en la corteza renal con respecto a los controles que disminuye en respuesta al tratamiento con quinapril (figura 35). Estos resultados sugieren que la disminución observada en el número de células inflamatorias en el área glomerular e intersticial en respuesta al tratamiento con quinapril (apartado 1.1.3) podría deberse a su efecto en la expresión renal del MCP-1.



**Figura 35.** Expresión génica del mRNA del MCP-1 en corteza renal. La figura (A) muestra una autoradiografía representativa del análisis por RT-PCR. Línea 1 (control), línea 2 (control tratado con quinapril), línea 3 (nefritis), línea 4 (nefritis-quinapril). (B) Análisis densitométrico de los resultados corregidos por el valor de la GAPDH y expresados como n-veces de incremento respecto al control, media  $\pm$  DE de 3 experimentos de RT-PCR con mezclas de RNA total de 4-6 animales por grupo.

En conjunto, hemos observado que las ratas con nefritis inmune no tratada presentan lesiones histológicas que se correlacionan con un aumento en la expresión génica de proteínas de matriz extracelular y de factores relacionados con la proliferación celular y la síntesis de matriz, como el TGF- $\beta$  y la preproET-1. Además, el aumento de infiltrado a nivel renal coincide con un incremento en la expresión renal del factor quimiotáctico MCP-1. En respuesta al tratamiento con quinapril mejoran las lesiones y disminuye el incremento observado en la expresión de los genes de proteínas de matriz y de las citoquinas, TGF- $\beta$ , preproET-1 y MCP-1, lo que sugiere que el mecanismo del efecto beneficioso de este fármaco puede sers debido al control en la expresión de determinados genes.

## **RESULTADOS**

### **Estudios *In vitro***

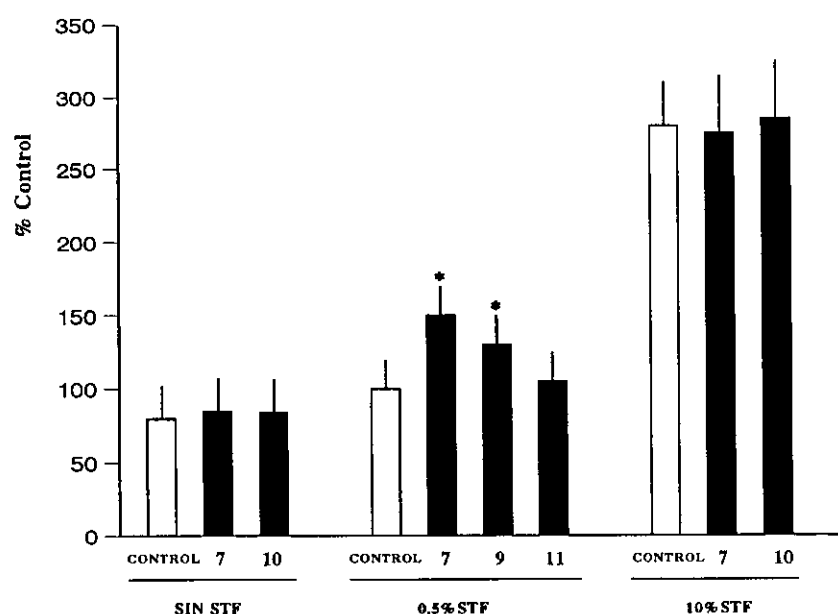
## 1. PAPEL DE LA ANGII EN LA PATOGENIA DE LA ESCLEROSIS RENAL.

### 1.1. Estudio de la interacción AngII y células mesangiales.

#### 1.1.1. Efecto de la AngII sobre la proliferación celular.

El efecto de la AngII sobre la proliferación mesangial es controvertido, por lo que comenzamos estudiando el efecto mitogénico de la AngII en células mesangiales de rata, con un pase de cultivo (al existir datos que indican la pérdida de receptores de AngII al aumentar el número de pases), en presencia de distintas cantidades de suero de ternera fetal (STF). La cuantificación se realizó mediante dos técnicas, la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina al DNA y el método del azul de metileno.

La estimulación con AngII durante 24h en presencia de 0.5% de STF indujo un aumento en la proliferación de las células mesangiales de forma dosis dependiente (figura 36 y 37). La dosis de  $10^{-7}\text{M}$  fue la de mayor efecto mitogénico ( $165 \pm 21\%$  vs basal 100,  $n=5$ ,  $p < 0.05$ , incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina), que comparado con el control positivo (10% STF) mostró que la AngII es un agente mitogénico débil (figura 36).

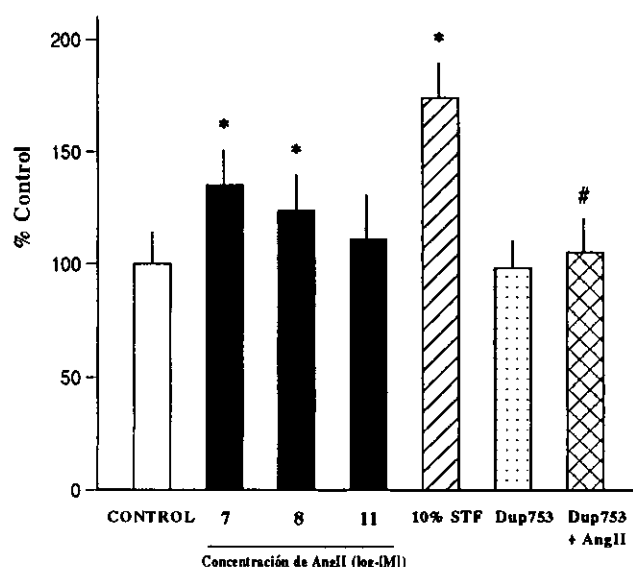


**Figura 36.** Efecto de la AngII sobre la proliferación de células mesangiales de rata, cuantificado mediante el método de incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina al DNA. Las células fueron incubadas con diversas dosis de AngII (desde  $10^{-7}\text{M}$  a  $10^{-11}\text{M}$ ) durante 24h en ausencia de STF y en presencia de 0.5% y 10% de STF. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (dpms/pocillo, con respecto a un valor arbitrario de 100 para el basal) como media  $\pm$  EEM de 5 experimentos realizados por duplicado, \* $p < 0.05$  vs control.

En ausencia de STF en el medio de incubación no se observó un aumento en la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina con respecto al basal en respuesta a la estimulación con AngII (figura 36). Esto sugiere que la AngII requiere la presencia de cofactores en el medio de cultivo para poder producir una respuesta proliferativa.

Los resultados en presencia de 10%STF en el medio de incubación no mostraron un efecto aditivo de la AngII a la proliferación inducida por el suero (figura 36). Resultados similares han sido obtenidos por Ray en células fetales, estos autores demuestran que el medio con 20%STF contiene proteasas capaces de degradar la AngII (Ray et al., 1994).

Posteriormente estudiamos la participación del receptor  $\text{AT}_1$  de la AngII en el efecto proliferativo, mediante el método del azul de metileno. Las células mesangiales se preincubaron durante 30 min con DUP753 ( $10^{-6}\text{M}$ ), un antagonista de este receptor, y posteriormente se estimularon con  $10^{-7}\text{M}$  AngII durante 24h observándose una inhibición de un  $79 \pm 2\%$  ( $n=4$ ) en la proliferación celular (figura 37).



**Figura 37.** Efecto de la AngII sobre la proliferación de células mesangiales de rata, cuantificado mediante el método del azul de metileno. Las células fueron incubadas con diversas dosis de AngII (desde  $10^{-7}\text{M}$  a  $10^{-11}\text{M}$ ) durante 24h en presencia de 0.5%STF. Las células fueron preincubadas durante 1h con el antagonista del receptor  $\text{AT}_1$ , Dup753 ( $10^{-6}\text{M}$ ) y posteriormente estimuladas con AngII ( $10^{-7}\text{M}$ ) durante 24h. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (unidades absorción/pocillo, valor de 100 para el control), como media  $\pm$  EEM de 5 experimentos realizados por triplicado, \* $p < 0.05$  vs control, # $p < 0.05$  vs AngII.

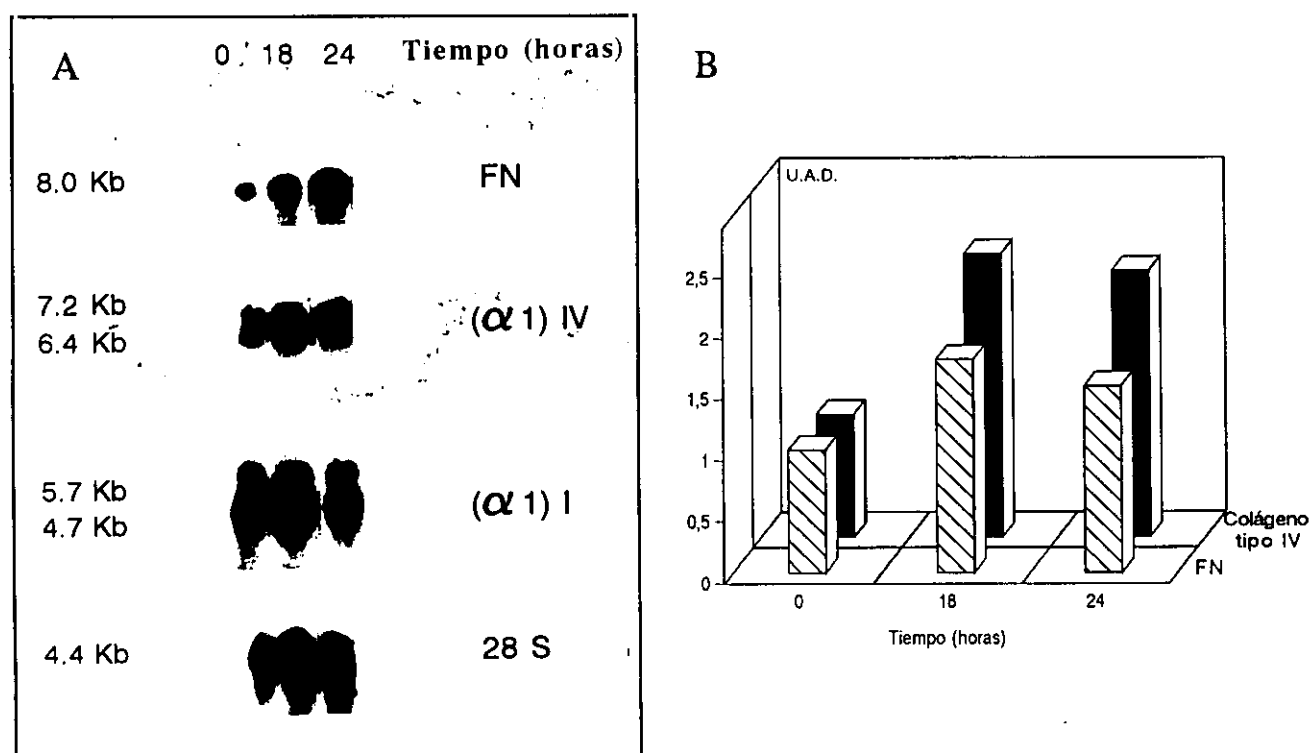
En conjunto estos resultados muestran que la AngII es un agente mitogénico que puede contribuir a la proliferación mesangial.

### 1.1.2. Efecto de la AngII sobre la expresión y síntesis de proteínas de matriz extracelular.

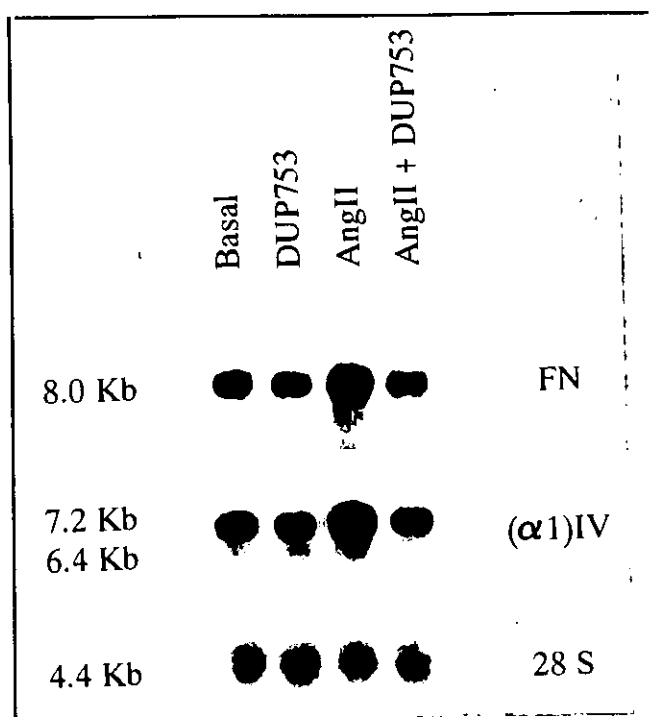
La expansión de la matriz mesangial constituye uno de los mecanismos implicados en la esclerosis glomerular progresiva (Striker et al., 1989; Kashgarian et al., 1992). Los estudios realizados durante los cinco últimos años, entre ellos los resultados incluidos en este apartado, sugieren que la AngII es un factor de crecimiento renal, implicado en procesos de síntesis de proteínas de matriz extracelular. El siguiente grupo de experimentos se diseñaron con el objetivo de estudiar el efecto de la AngII en la síntesis de proteínas de matriz en células mesangiales profundizando en los mecanismos de regulación de la matriz y determinando el papel de diversos mediadores en este proceso.

#### 1.1.2.1. Efecto de la AngII sobre la expresión de proteínas de matriz extracelular.

Las células mesangiales en reposo fueron estimuladas con distintas dosis de AngII. Pasado el tiempo de incubación se extrajo el RNA y se analizó la expresión de proteínas de matriz mediante técnicas de Northern blot. La AngII indujo un aumento significativo en la expresión del mRNA de la fibronectina y del colágeno tipo IV (figura 38) con un máximo de expresión tras 18h de incubación a la dosis de  $10^{-7}$ M (1,7- y 2,32-veces incremento vs basal, respectivamente). Este fenómeno ocurrió a través de la unión al receptor  $AT_1$ , ya que la incubación en presencia de Dup753 ( $10^{-6}$ M) inhibió el incremento en la expresión de estos genes (69% y 73% respectivamente, %inhibición vs AngII,  $n=3$ ,  $p<0.05$ ) (figura 39). Por el contrario, la AngII no modificó a ninguna de las dosis estudiadas la expresión del colágeno tipo I (figura 38).



**Figura 38.** Efecto de la AngII en la expresión del mRNA de proteínas de matriz extracelular en células mesangiales. Las células fueron incubadas durante 18 y 24h con  $10^{-7}$ M de AngII. Finalizada la incubación, se extrajo el RNA y se sometió a electroforesis y transferencia. (A) Northern blot representativo de 3 realizados, correspondiente a la hibridación con las sondas de FN, colágenos tipo IV ((α1)IV) y tipo I ((α1)I) y 28S. Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda. (B) Cuantificación de las bandas. Los resultados están expresados, en unidades arbitrarias de densitometrado, como n-veces de aumento respecto al basal.



**Figura 39.** Efecto del antagonista de los receptores  $AT_1$  en la expresión del mRNA de proteínas de matriz extracelular en células mesangiales. Las células fueron preincubadas durante 1h con el antagonista del receptor  $AT_1$ , Dup753 ( $10^{-6}M$ ) y posteriormente estimuladas con AngII ( $10^{-7}M$ ) durante 24h. La figura muestra un northern blot representativo de 3 realizados, correspondiente a la hibridación con las sondas de FN y Col IV. Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda.

#### 1.1.2.2. Efecto de la AngII sobre la síntesis de proteínas de matriz extracelular.

Para determinar si este aumento de la expresión génica se traducía en la síntesis *de novo* de estas proteínas, estudiamos la producción de fibronectina (FN). Escogimos la FN como proteína representativa de los componentes de la matriz extracelular, al ser las células mesangiales la principal fuente de FN. Además, esta glicoproteína es el mayor componente de la matriz mesangial en rata (Courtney et al., 1982) y está aumentada significativamente en el mesangio de pacientes humanos con glomerulonefritis mesangiales proliferativas (Weiss et al., 1989), así como en el modelo experimental estudiado en este trabajo (ver página 55).

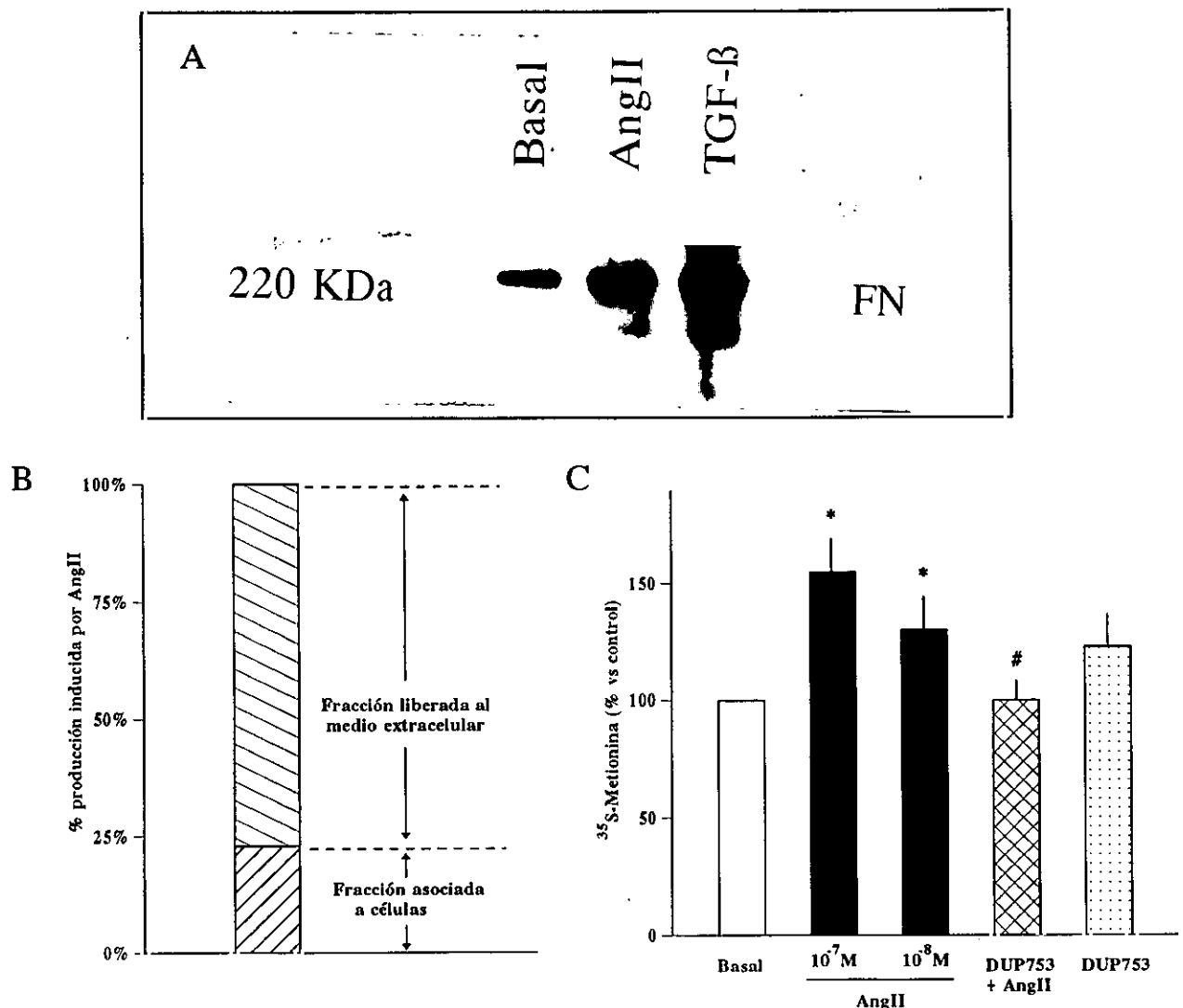
Como ha sido señalado previamente, el patrón de la secreción de la matriz extracelular mesangial y la incorporación de las proteínas recién sintetizadas dependen del grado de confluencia de las células (Wolthius et al., 1993). En experimentos preliminares, hemos observado que en células supraconfluentes no se produce un aumento en la síntesis de FN en respuesta a estímulos como el TGF- $\beta$  y el PAF. Por este motivo, con el fin de homogeneizar los resultados todos los experimentos se realizaron en células confluentes (alrededor del 90%).

Las células mesangiales fueron marcadas metabólicamente con  $^{35}S$ -Metionina y se incubaron durante 24h con AngII en presencia de 0.5%STF. Las proteínas sintetizadas *de novo* se inmunoprecipitaron con un anticuerpo policlonal anti-FN (obtenido en el laboratorio), analizándose mediante electroforesis en PAGE-SDS, en condiciones reductoras. La estimulación con AngII, a las dosis de  $10^{-7}$  y  $10^{-8}M$ , indujo un aumento en la síntesis de FN total de 155% y 130% respectivamente (%incremento vs basal, el cual fue considerado como 100%,  $n=10$ ,  $p<0.05$ ) (figura 40). La mayor parte de la FN producida se libera al sobrenadante (alrededor de un 80%), aunque la AngII también aumenta la FN asociada a células (figura 40).



La preincubación de las células mesangiales con el antagonista del receptor  $AT_1$ , el Dup753 ( $10^{-6}M$ ), inhibió la síntesis de FN inducida por la AngII (figura 40). No obstante, este compuesto parece tener un efecto agonista en algunas condiciones, ya que a altas dosis induce un aumento significativo en la síntesis de FN (DUP753 ( $10^{-4}M$ ): 206% incremento vs basal,  $n=3$ ,  $p<0.05$  vs basal). Resultados análogos han sido mostrados en células mesangiales humanas, en presencia de 2%STF (Nahman et al., 1993).

Estos resultados demuestran que la AngII induce la expresión y síntesis de proteínas de matriz extracelular en células mesangiales de rata, confirmando los resultados obtenidos en células mesangiales murinas (Wolf et al., 1992), humanas (Ray et al., 1994) y de rata (Kagami et al., 1994).

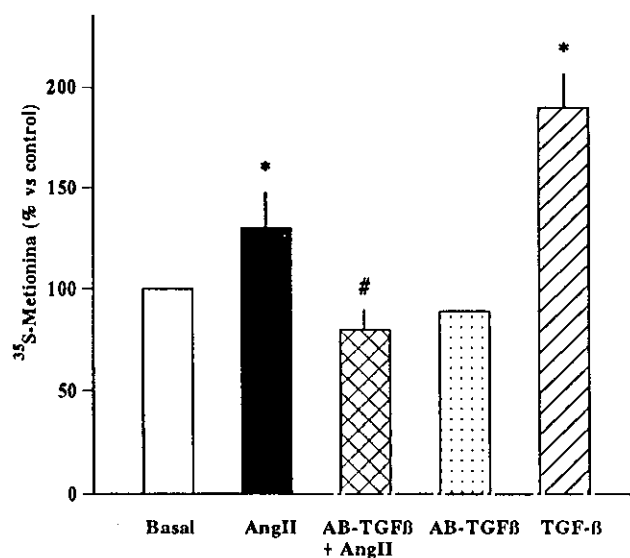


**Figura 40.** Producción de FN por células mesangiales estimuladas con AngII. (A) Autorradiografía representativa del análisis por PAGE-SDS de la FN soluble. Las células se marcaron metabólicamente con  $^{35}S$ -Metionina, en presencia de 0.5%STF, y se incubaron durante 24h con AngII, cuantificándose la síntesis mediante inmunoprecipitación con anticuerpos anti-FN. (B) Relación de la FN soluble asociada a células producida por la AngII. (C) Dosis respuesta de AngII y efecto del antagonista de los receptores  $AT_1$ . Las células fueron preincubadas durante 1h con el antagonista del receptor  $AT_1$ , Dup753 ( $10^{-6}M$ ) y posteriormente estimuladas con AngII ( $10^{-7}M$ ). Los resultados están expresados, en unidades arbitrarias de densitometrado, como % de producción de FN respecto al basal (el cual se tomó en cada experimento como 100). Los datos representan la Media  $\pm$  EEM de 8-12 experimentos, \* $p<0.05$  vs basal, # $p<0.05$  vs AngII sola.

### 1.1.2.3. Papel del TGF- $\beta$ en la síntesis de FN inducida por AngII.

En los últimos años se ha demostrado el papel primordial del TGF- $\beta$  en la regulación de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (Kaname et al., 1992; Border et al., 1992). En células mesangiales de rata el TGF- $\beta$  induce la síntesis de FN, colágenos y proteoglicanos (Hansch et al., 1995). Además, se ha demostrado que participa en la síntesis de proteínas de matriz inducida por diversas sustancias, como tromboxano A2 (Studer et al., 1994) e inmunocomplejos de IgG (López-Armada et al., 1994). El siguiente punto de nuestro estudio fue por tanto determinar la posible participación del TGF- $\beta$  en la síntesis de FN inducida por la AngII.

La incubación de las células con un anticuerpo neutralizante de TGF- $\beta$ 1 bloqueó la síntesis de FN inducida por la AngII (figura 41). En experimentos control determinamos que este fenómeno era específico del TGF- $\beta$ , ya que en presencia de una IgG no relacionada no se observó este efecto (resultados no mostrados).



**Figura 41.** Efecto de un anticuerpo neutralizante anti-TGF $\beta$  en la síntesis de FN inducida por AngII en células mesangiales. Las células se marcaron metabólicamente con  $^{35}\text{S}$ -Metionina, se incubaron con AngII ( $10^{-8}\text{M}$ ) en presencia/ausencia de  $10\mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo anti-TGF $\beta$  durante 24h. Los resultados están expresados como % de producción de FN respecto al basal (el cual se tomó como 100 en cada experimento). Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos, # $p < 0.05$  vs AngII sola, \* $p < 0.05$  vs basal.

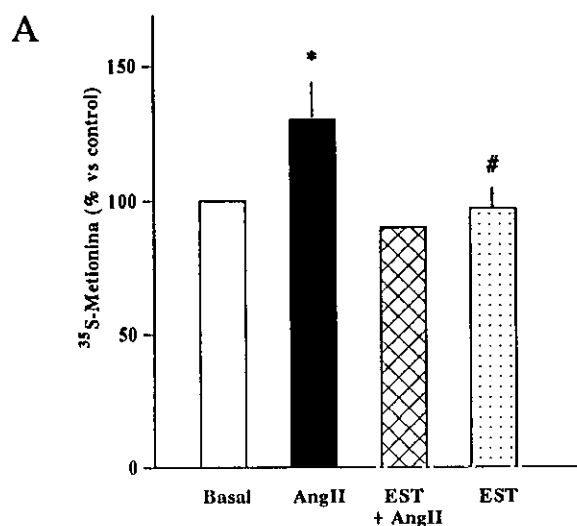
En la figura 41 podemos observar que la síntesis de FN inducida en respuesta a la estimulación con la AngII es menor con el TGF- $\beta$  ( $190 \pm 17\%$  incremento respecto al basal,  $n=3$ ,  $p < 0.05$ , dosis de  $50\text{pM}$ ), lo que demuestra que la AngII es un inductor débil de la síntesis de FN.

Estos resultados sugieren que parte del efecto de la AngII sobre la síntesis de proteínas de matriz extracelular es debido a la síntesis endógena de TGF- $\beta$ . Estos datos han sido confirmandos recientemente por el grupo de Border, demostrando que la infusión *in vivo* de AngII produce un aumento de la síntesis glomerular de TGF $\beta$  y que en células mesangiales en cultivo la AngII aumenta la expresión y la síntesis de TGF- $\beta$ , y promueve su conversión a la forma biológicamente activa (Kagami et al., 1994).

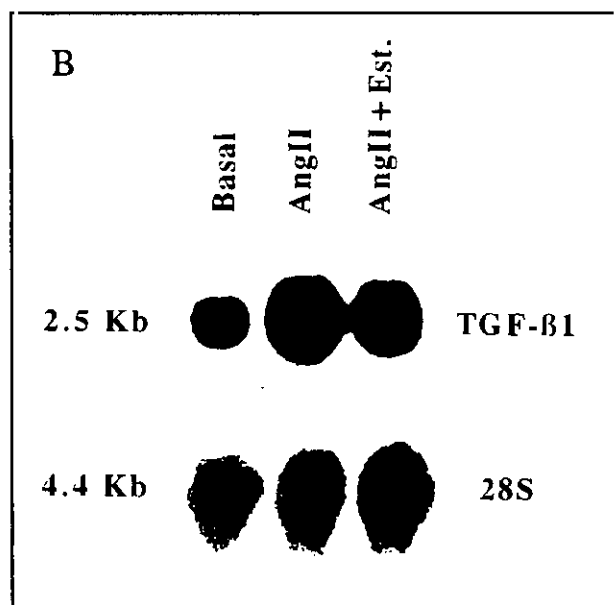
#### 1.1.2.4. Papel de la activación de la proteína quinasa C (PKC) en los fenómenos inducidos por AngII.

La unión de la AngII al receptor  $AT_1$  desencadena una secuencia de reacciones entre las que cabe destacar la activación de la PKC. En células mesangiales, la activación de esta proteína quinasa, mediante el empleo de esteres de forbol, induce un incremento en la síntesis de FN (Studer et al., 1995) y en la expresión de TGF- $\beta$  (Kaname et al., 1992). Además, en células de músculo liso vascular, la AngII induce la expresión de TGF- $\beta$  por un mecanismo dependiente de PKC (Gibbons et al., 1992). En virtud de estos datos, abordamos el estudio de la participación de la PKC en la síntesis de FN y en la expresión de TGF- $\beta$ 1 inducidas por la AngII.

La preincubación durante 30 minutos con estaurosporina ( $10^{-7}M$ ) (un inhibidor de PKC) abolió la síntesis de FN inducida por la AngII (figura 42). La dosis empleada no afectó a la viabilidad celular. La preincubación durante 1h con estaurosporina ( $10^{-5}M$ ) mostró una disminución de alrededor del 70% en el aumento del mRNA del TGF- $\beta$ 1 inducido por la AngII (figura 42). Estos resultados sugieren un mecanismo dependiente de PKC en los fenómenos estudiados.



**Figura 42.** Efecto de la inhibición de la PKC en los fenómenos inducidos por AngII en células mesangiales. (A) Efecto en la síntesis de FN. Las células marcadas metabólicamente se preincubaron durante 30 minutos con estaurosporina ( $10^{-7}M$ ) y, posteriormente, se estimularon con AngII ( $10^{-8}M$ ) durante 24h. Los resultados están expresados como % de producción de FN vs basal (el cual se tomó como 100 en cada experimento). Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos, # $p < 0.05$  vs AngII sola, \* $p < 0.05$  vs basal.



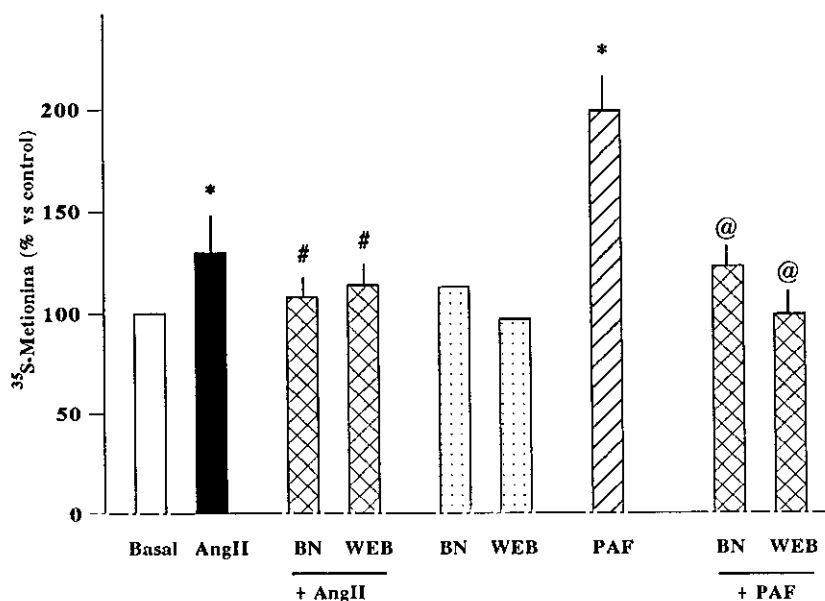
(B) Efecto en la expresión del mRNA del TGF- $\beta$ 1. Las células fueron preincubadas durante 1h con estaurosporina ( $10^{-5}M$ ) y posteriormente estimuladas con AngII ( $10^{-7}M$ ) durante 6 h. Finalizada la incubación, se extrajo el RNA y se sometió a electroforesis y transferencia. La hibridación se realizó con la sonda del TGF- $\beta$ 1 marcada radiactivamente. La figura muestra un Northern blot representativo de 2 realizados. Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda.

### 1.1.2.5. Papel del PAF en la síntesis de FN inducida por AngII.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el PAF regula la síntesis de proteínas de matriz extracelular en diferentes células renales. En células epiteliales glomerulares inhibe la síntesis de proteoglicanos (Bustos et al., 1995). En células mesangiales y epiteliales glomerulares, fibroblastos intersticiales y células epiteliales tubulares aumenta la expresión de diversas proteínas de matriz, entre otras de FN (Ruiz-Ortega et al., 1994).

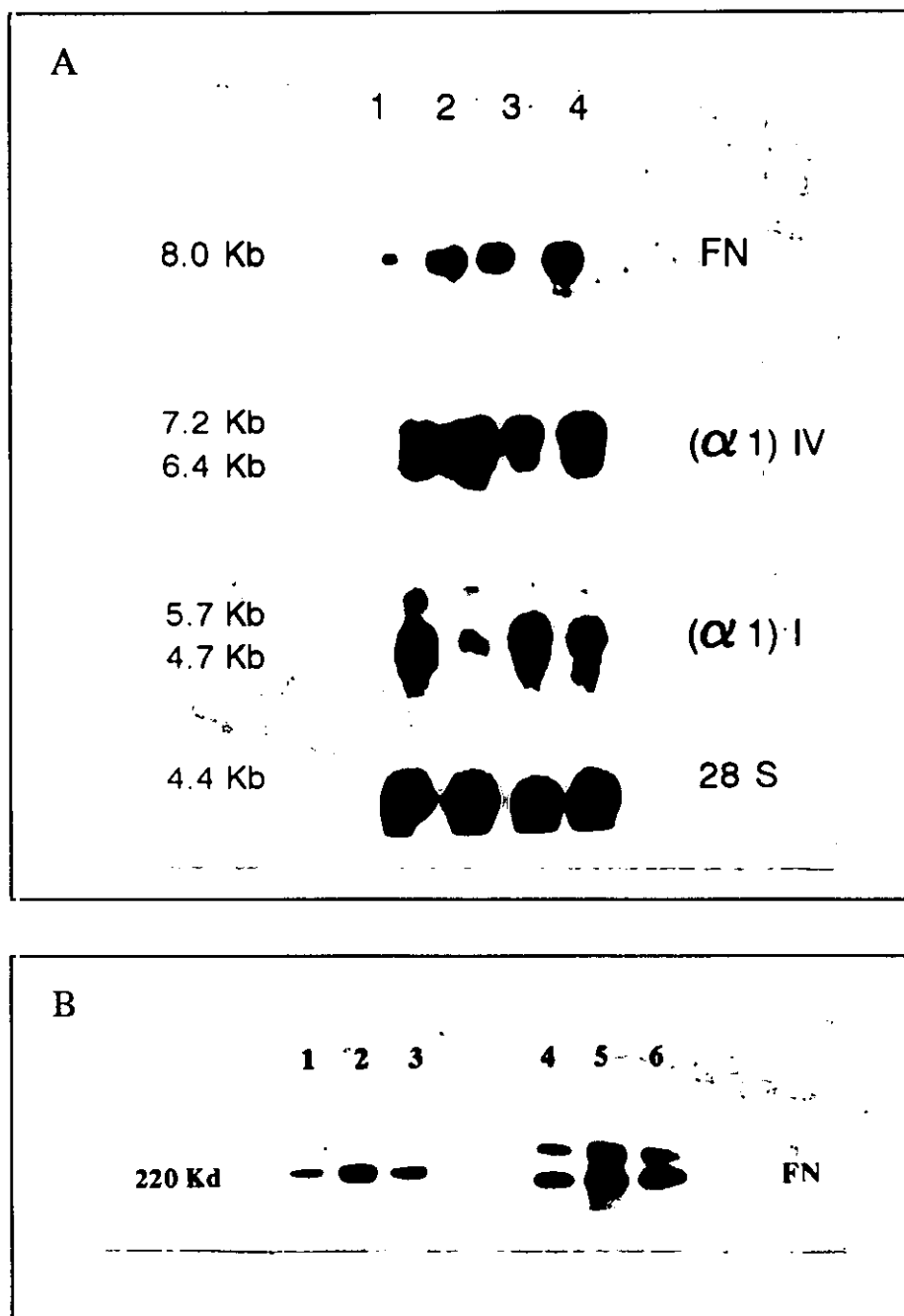
La AngII es capaz de inducir la síntesis de PAF en células mesangiales en cultivo (Schlondorff et al., 1987). Por lo que abordamos, en primer lugar, la hipótesis de que parte del efecto de la AngII sobre la síntesis de FN pudiera deberse a la síntesis de PAF. En segundo lugar, comparamos el efecto de este lípido y de la AngII en la producción de proteínas de matriz y en los mecanismos implicados en estos procesos, con el propósito de elucidar los mecanismos de control de la regulación de la matriz mesangial.

El PAF da lugar a diferentes respuestas celulares mediante la unión a sus receptores (Chao et al., 1993), por lo que empleamos dos antagonistas de los receptores del PAF con estructuras químicas diferentes, el BN52021, un terpeno derivado del *Ginkgo biloba* (Braquet et al., 1991), y el WEB2086, un antagonista químico del grupo de las triazobenzodiazepinas (Casals-Stenzel et al., 1987). En estudios previos hemos demostrado que estos compuestos no tienen efecto en la síntesis de FN, y que inhiben la síntesis de FN inducida por el PAF (Ruiz-Ortega, et al., 1994). La preincubación durante 1h con BN52021 ( $10^{-5}$  M) y WEB2086 ( $10^{-5}$  M) inhibió la síntesis de FN inducida por AngII, en un  $31 \pm 8\%$  y  $38 \pm 12\%$  ( $n=3$ ), respectivamente (figura 43). Estos resultados sugieren que parte del efecto de la AngII podría deberse a la síntesis de PAF inducida por la AngII.



**Figura 43.** Efecto de dos antagonistas específicos de los receptores del PAF en la síntesis de FN inducida por AngII en células mesangiales. Las células marcadas metabólicamente se preincubaron durante 1 h con BN52021 ( $10^{-5}$ M) y WEB2086 ( $10^{-5}$ M) y, posteriormente, se estimularon con AngII y PAF ( $10^{-6}$ M) durante 24h. Los resultados están expresados como % de producción de FN vs basal (el cual se tomó como 100 en cada experimento). Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos, # $p < 0.05$  vs AngII sola, \* $p < 0.05$  vs basal, @ $p < 0.05$  vs PAF solo.

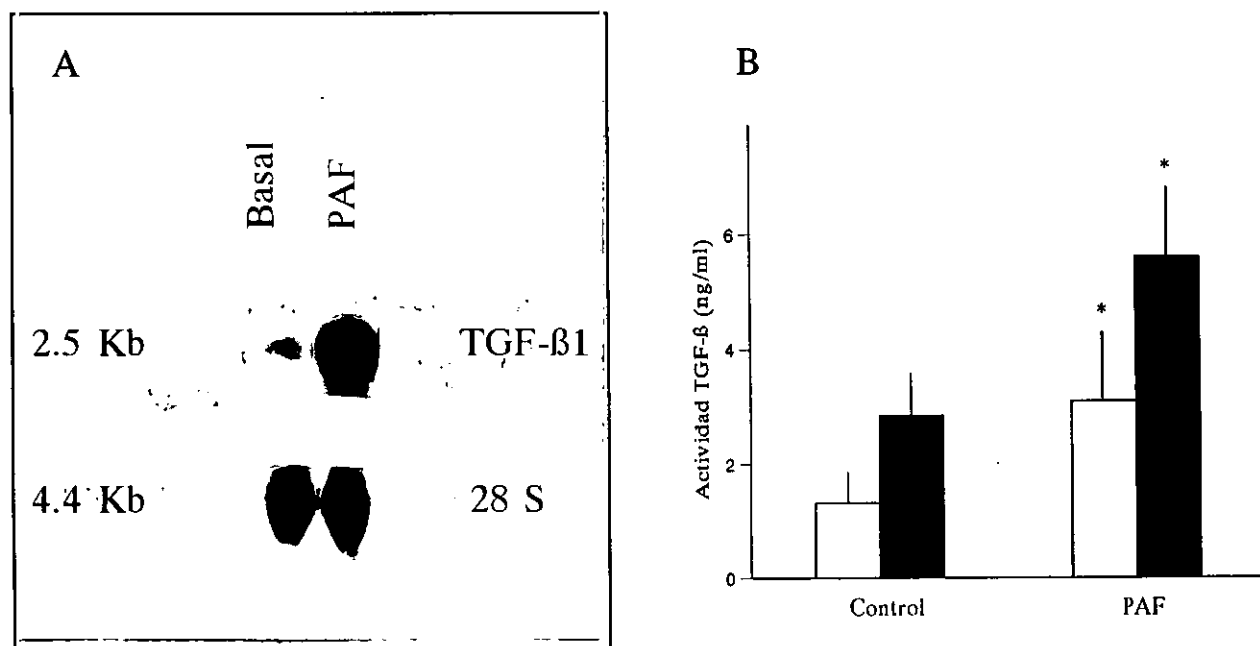
El PAF es un inductor más potente de la expresión de proteínas de matriz que la AngII. Este lípido a  $10^{-8}$ M incrementó la expresión del mRNA de la FN y del colágeno tipo IV en 1,9 y 2,5-veces vs basal, respectivamente, no modificando la expresión del colágeno tipo I (figura 44A). También comparamos el efecto de ambas sustancias en la síntesis de FN. El PAF produjo un aumento en la síntesis de esta proteína, mayor que el inducido por la AngII (PAF:  $180 \pm 45\%$ , AngII:  $130 \pm 3\%$  incremento respecto al basal,  $n=4$ , dosis de  $10^{-8}$ M). (figura 44).



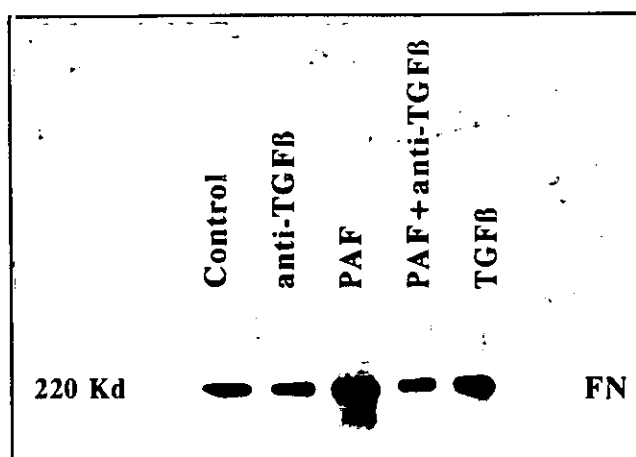
**Figura 44.** Efecto del PAF en la expresión y síntesis de proteínas de matriz extracelular en células mesangiales. (A) Northern blot representativo, correspondiente a la hibridación con las sondas de FN, colágenos tipo (α1)IV y tipo (α1)I y 28S. Las células fueron estimuladas con PAF ( $10^{-8}$ M) durante 18 a 24h. La figura representa 1: Basal 18h, 2: PAF 18h, 3: Basal 24h y 4: PAF 24h. Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda. (B) Autorradiografía representativa del análisis por PAGE-SDS de la FN producida por el PAF. Las células marcadas metabólicamente se incubaron durante 24h con varias dosis de PAF. La figura muestra la FN soluble (1-3) y asociada a células (4-6); líneas 1,4 (Basal), líneas 2,3 ( $10^{-8}$ M PAF), líneas 3,6 ( $10^{-10}$ M PAF).

Con el propósito de establecer si los mecanismos de producción de FN por el PAF son similares a la AngII, estudiamos la implicación del TGF- $\beta$  en los fenómenos inducidos por el PAF. Para ello determinamos el efecto del PAF sobre la expresión y síntesis de TGF- $\beta$ , así como el papel del TGF- $\beta$  en la síntesis de FN inducida por el PAF.

Las células mesangiales fueron incubadas con  $10^{-8}$ M de PAF durante 6h; posteriormente se extrajo el RNA y se cuantificó la expresión de TGF- $\beta$ 1 por técnicas de Northern blot. Como observamos en la figura 45A, la estimulación con PAF indujo un incremento en la expresión del mRNA del TGF- $\beta$ 1. Para estudiar la síntesis de TGF- $\beta$ , las células mesangiales fueron estimuladas con  $10^{-8}$ M PAF durante 48h, en un medio libre de suero, y se cuantificó la actividad del TGF- $\beta$  mediante el bioensayo de inhibición de la proliferación de las células CCL-64 (Danierpour et al., 1989). El PAF indujo un aumento en la liberación del TGF- $\beta$  activo y del total (determinado tras el tratamiento ácido de los mismos medios condicionados) con respecto a las células sin estimular ( $p < 0.05$ ) (figura 45). En condiciones basales tan sólo el 26% del TGF- $\beta$  total es secretado en forma activa, mientras que en respuesta al tratamiento con PAF se eleva a un 50% ( $p < 0.01$ ). Estos resultados indican que el PAF no sólo aumenta la producción del TGF- $\beta$  activo y latente, sino también la conversión a la forma biológicamente activa. La coincubación de PAF y un anticuerpo neutralizante del TGF- $\beta$  disminuyó la síntesis de FN inducida por PAF, determinada por marcaje metabólico e inmunoprecipitación (figura 46).

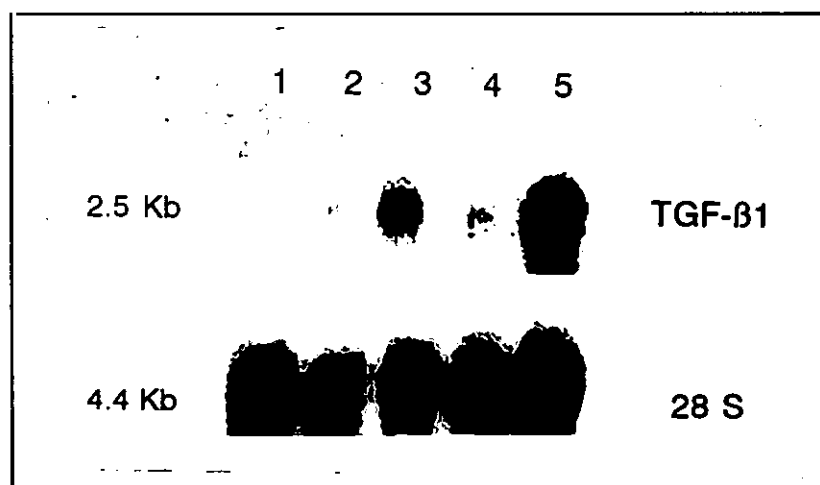


**Figura 45. Efecto del PAF en la expresión (A) y síntesis (B) de TGF- $\beta$ 1.** La figura A muestra un Northern blot representativo de la hibridación con la sonda de TGF- $\beta$ 1. Las células fueron incubadas con  $10^{-8}$ M PAF durante 6h. La figura B representa la producción de TGF $\beta$  en respuesta a la estimulación con PAF durante 48h en un medio libre de suero. La actividad del TGF- $\beta$  se cuantificó en el medio de cultivo, antes y después del tratamiento ácido, mediante el bioensayo con CCL-64. Las barras blancas representan la Media  $\pm$  EEM de la actividad del TGF- $\beta$  en el sobrenadante de tres cultivos de células estimuladas o no con  $10^{-8}$ M PAF. Las barras negras representan la Media  $\pm$  EEM de la actividad del TGF- $\beta$  de los mismos sobrenadante después de tratamiento ácido para activar el TGF- $\beta$  latente, \* $p < 0.05$  vs control.



**Figura 46.** Papel del TGF- $\beta$  en la síntesis de FN inducida por el PAF. Las células marcadas metabólicamente se incubaron con PAF ( $10^{-8}$ M) en presencia/ausencia de  $10\mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo neutralizante del TGF- $\beta$  durante 24h. La figura representa una autorradiografía del análisis por PAGE-SDS de la FN soluble (experimento representativo de 3 realizados).

El siguiente objetivo fue determinar si al igual que ocurre con la AngII, la PKC participa en la respuesta al PAF. La unión del PAF a su receptor en células mesangiales estimula la síntesis de ácido araquidónico y la liberación de  $\text{PGE}_2$ , aumentando la concentración de calcio intracelular y activando la PKC (Kester et al., 1992). Por tanto estudiamos la participación de la activación de la PKC en la expresión de TGF- $\beta$  inducida por el PAF. La preincubación durante 1h con estaurosporina mostró una disminución del 70% en el aumento del mRNA del TGF- $\beta 1$  inducido por el PAF (figura 47), lo que sugiere un mecanismo dependiente de PKC en la regulación de la expresión del TGF- $\beta$  para AngII y PAF.

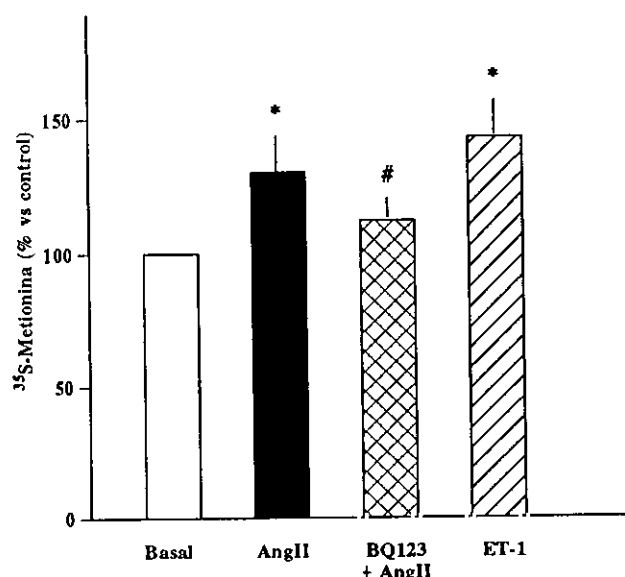


**Figura 47.** Papel de la PKC en la expresión de TGF- $\beta 1$  inducida por PAF en células mesangiales. Las células fueron preincubadas durante 1h con estaurosporina ( $10^{-5}$ M) y posteriormente estimuladas con PAF ( $10^{-8}$ M) durante 6 h. Finalizada la incubación, se extrajo el RNA y se sometió a electroforesis y transferencia. La hibridación se realizó con la sonda del TGF- $\beta 1$  marcada radiactivamente. La figura muestra un Northern blot representativo de 2 realizados. Línea 1 (Basal), línea 2 (Estaurosporina), línea 3 (PAF), línea 4 (PAF+Estaurosporina), línea 5 (PMA). Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda.

### 1.1.2.6. Papel de la ET-1 en la síntesis de FN inducida por AngII.

En células mesangiales, la ET-1 induce la expresión del mRNA de colágeno (tipos I y IV) y laminina (Ishimiura et al., 1991). En estudios realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que la ET-1 aumenta la síntesis de FN a través de la unión al receptor  $ET_A$ . Se han descrito varios fenómenos inducidos por la AngII que están mediados por la acción de la ET-1. El antagonista del receptor  $ET_A$  de la endotelina BQ123 inhibe la contracción inducida por la AngII en aorta de conejo (Webb et al., 1992). A su vez, parte del efecto proliferativo de la AngII es debido a la síntesis endógena de ET-1 (Bakris et al., 1993). Por ello, el siguiente objetivo fue determinar la participación de la ET-1 en la síntesis de FN inducida por AngII.

El efecto de la ET-1 en la síntesis de FN es mayor que el de la AngII (ET-1:  $143 \pm 4\%$ , AngII:  $130 \pm 3\%$  incremento respecto al basal,  $n=8$ , dosis de  $10^{-8}M$ ). La preincubación durante 1 h con BQ123 ( $10^{-6}M$ ), un antagonista de los receptores  $ET_A$ , indujo una inhibición en la síntesis de FN inducida por la AngII (40% incremento vs AngII,  $n=8$ ,  $p < 0.05$ ) (figura 48).



**Figura 48.** Efecto de un antagonista específico de los receptores de la ET-1 en la síntesis de FN inducida por AngII en células mesangiales. Las células marcadas metabólicamente se preincubaron durante 1 h con BQ123 ( $10^{-6}M$ ), antagonista de los receptores  $ET_A$ , y posteriormente se estimularon con AngII ( $10^{-8}M$ ) durante 24h. Los resultados están expresados como % de producción de FN vs basal (el cual se tomó como 100 en cada experimento). Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 6-8 experimentos, # $p < 0.05$  vs AngII sola, \* $p < 0.05$  vs basal.

En conjunto, los resultados del apartado 1.1.2 sugieren que la AngII aumenta la síntesis de proteínas de matriz extracelular por un mecanismo dependiente de la activación de la PKC y de la síntesis de factores de crecimiento endógenos, como el TGF $\beta$ , similar al utilizado por diversas sustancias, como el PAF. Además, hemos demostrado que la síntesis de lípidos bioactivos, como el PAF y péptidos vasoactivos, como la ET-1, también participan en este complejo proceso.



## 1.2. Estudio de la interacción AngII y citoquinas en células mesangiales.

Durante el daño glomerular, citoquinas inflamatorias, como la interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), pueden ser liberadas por macrófagos infiltrantes y por células glomerulares intrínsecas. Estas citoquinas pueden contribuir a la esclerosis renal, estimulando la proliferación mesangial y la síntesis de proteínas de matriz extracelular (revisado en Ortiz et al., 1994).

Como ya hemos comentado anteriormente, la AngII participa en los procesos de esclerosis glomerular, activando la producción de proteínas de matriz extracelular. En estudios realizados por nuestro grupo en el modelo de nefritis por inmunocomplejos se ha descrito un aumento en la síntesis glomerular de TNF- $\alpha$  en las ratas con nefritis (Ortiz et al., 1995). Esto, junto con los resultados observados en este trabajo del aumento en la producción local de AngII en este modelo (ver página 49), demuestran la presencia simultánea en el entorno glomerular de AngII y citoquinas inflamatorias en una situación de daño/esclerosis renal. Estos datos nos llevaron a plantear el estudio del posible interacción entre citoquinas inflamatorias y la AngII en la proliferación mesangial y en la regulación de la síntesis de proteínas de matriz extracelular como uno de los mecanismos potenciales de progresión de las enfermedades renales.

### 1.2.1. Efecto en la proliferación celular.

Como hemos demostrado en el apartado 1.1.1 la AngII, en presencia de 0.5%STF, es un agente mitogénico débil para las células mesangiales de rata. Recientemente se ha demostrado que el efecto proliferativo de la AngII es sinérgico en presencia de PDGF-BB, pero no con otros factores de crecimiento, como el EGF y TGF- $\beta$  (Marinides et al., 1993). Estos estudios han sido realizados en condiciones de cultivo similares a las que nosotros hemos empleado (células mesangiales de rata, número de pases, en presencia de 0.5%STF). Por ello examinamos el efecto proliferativo de la AngII en presencia de citoquinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) implicadas en procesos de glomeruloesclerosis asociados a proliferación mesangial.

La capacidad mitogénica de estas citoquinas en la proliferación mesangial es controvertida, tan sólo la IL-6 parece tener un claro efecto proliferativo (Ruef et al., 1990), por lo que en experimentos preliminares determinamos el efecto de diversas dosis en la proliferación celular. A las dosis empleadas, las tres citoquinas estudiadas presentaron un efecto ligero sobre la proliferación mesangial (tabla 12). Los resultados fueron obtenidos por el método del azul de metileno. La coincubación con AngII ( $10^{-7}$  M) no presentó efecto sinérgico en la proliferación inducida por las citoquinas (tabla 12). Resultados similares se obtuvieron por el método de incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina al DNA (no mostrados).

Tabla 12. Efecto de la coincubación de citoquinas y Ang II en la proliferación mesangial.

Estímulo	Azul Metileno
AngII ( $10^{-7}$ M)	$133 \pm 4$
IL-1 $\beta$ (10 U/ml)	$151 \pm 6$
IL-1 $\beta$ + AngII	$147 \pm 4$
IL-6 (10 U/ml)	$144 \pm 4$
IL-6 + AngII	$145 \pm 4$
TNF- $\alpha$ (100 U/ml)	$150 \pm 3$
TNF- $\alpha$ + AngII	$146 \pm 2$

Nota: Los estudios se han realizado en RPMI con 0.5% STF durante 24h de incubación, mediante el método de azul de metileno. Los resultados se expresan como %incremento vs basal (considerado como 100) y son la media de 5 experimentos realizados por triplicado.

La proliferación celular se ha asociado a la inducción de algunos genes de respuesta temprana, como el c-fos (Tsuda et al., 1986), por esto nos planteamos determinar si la presencia simultánea de AngII y citoquinas proinflamatorias en células mesangiales presentaban un efecto sinérgico en la inducción del mRNA del c-fos, estudiando en concreto el efecto de la coincubación de AngII e IL-1 $\beta$ . La AngII induce la expresión de c-fos en células mesangiales (Rosenberg et al., 1993). Las células mesangiales fueron estimulados durante 1h con AngII ( $10^{-7}$  M) o IL-1 $\beta$  (10U/ml). Pasado el tiempo de incubación se extrajo el RNA y se analizó la expresión del mRNA de c-fos mediante Northern blot. En la figura 49 observamos que el efecto de la coincubación de AngII e IL-1 $\beta$  sobre la expresión de c-fos es similar a lo observado con ambas sustancias de manera aislada.

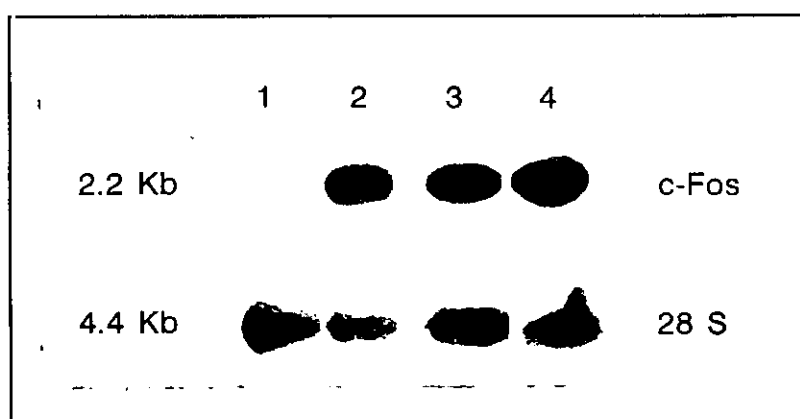


Figura 49. Efecto de la coincubación de AngII e IL-1 $\beta$  en la expresión del mRNA de c-fos en células mesangiales. Las células, en estado de reposo, fueron incubadas simultáneamente con IL-1 $\beta$  (10U/ml) y AngII ( $10^{-7}$  M) durante 1h. La figura muestra un Northern blot representativo de 2 realizados. Línea 1 (Basal), línea 2 (AngII), línea 3 (IL-1 $\beta$ ), línea 4 (AngII + IL-1 $\beta$ ). Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda.

### 1.2.2. Efecto en la síntesis de proteínas de matriz extracelular

#### *1.2.2.1. Efecto de la coincubación de AngII y citoquinas en la síntesis de FN*

Las células mesangiales, marcadas metabólicamente con  $^{35}\text{S}$ -Metionina, se incubaron simultáneamente en presencia de citoquinas, IL-1 $\beta$  (10U/ml) o TNF- $\alpha$  (100U/ml), y AngII ( $10^{-7}$  M) durante 24h, en medio RPMI con 0.5%STF. Cada una de las citoquinas estudiadas indujo, de manera aislada, un aumento significativo en la síntesis *de novo* de FN, cuantificada mediante inmunoprecipitación. La coincubación de AngII e IL-1 $\beta$ , indujo una disminución, prácticamente hasta valores basales, de la producción de FN con respecto a la síntesis inducida por la IL-1 $\beta$  de manera aislada. Este fenómeno se observó tanto en la fracción soluble como en la asociada a células (figura 50). Un efecto similar se observó al coincubar la AngII y el TNF- $\alpha$  (figura 50).

#### *1.2.2.2. Efecto en la expresión de FN. Mecanismos de regulación*

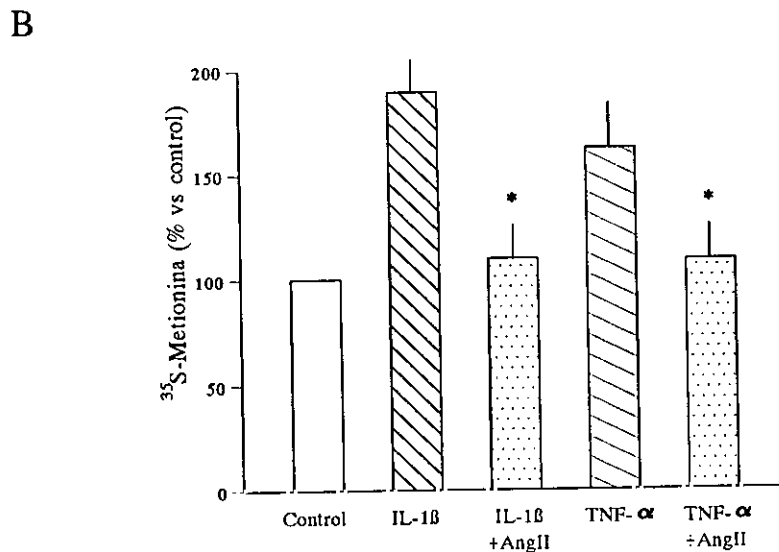
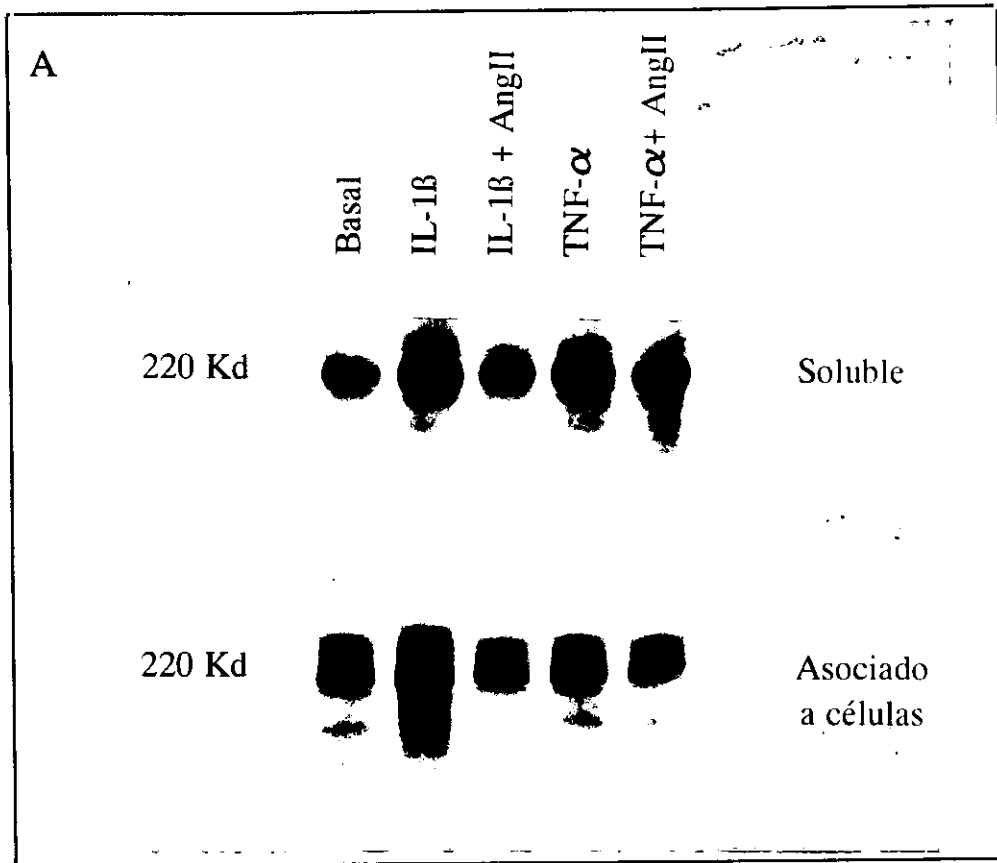
Hemos estudiado si el efecto observado en la síntesis de FN ocurría también a nivel de la regulación del mRNA de la FN.

Las células mesangiales se coincubaron en presencia de IL-1 $\beta$  (10U/ml) o TNF- $\alpha$  (100U/ml) y AngII ( $10^{-7}$ M) durante 24h. Pasado el tiempo de incubación se extrajo el RNA y se analizó la expresión de FN mediante técnicas de Northern blot. La coincubación de AngII e IL-1 $\beta$  inhibió el aumento en la expresión del mRNA de FN observado con la citoquina sola, mientras que cuando se coincubaron la AngII y TNF- $\alpha$  no se modificó la expresión del gen de la FN inducida por el TNF- $\alpha$  de manera aislada (figura 51).

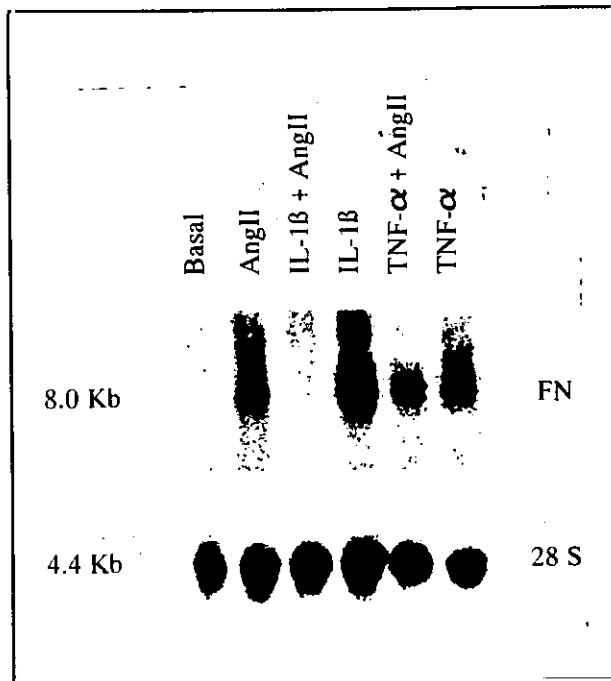
Estos resultados sugerían una posible regulación post-transcripcional diferente en los procesos inducidos por la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , por ello investigamos el efecto de la inhibición de la transcripción y de la síntesis de proteínas en estos procesos.

La inhibición de la transcripción, mediante la preincubación durante 1h con actinomicina D (Act D, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), dió lugar a una disminución en la expresión del mRNA de la FN inducido por la coincubación de AngII con cada una de las citoquinas (figura 52), sugiriendo que el fenómeno observado se debe a la transcripción de RNA, presumiblemente de mRNA de FN y no a la presencia de un RNA muy estable.

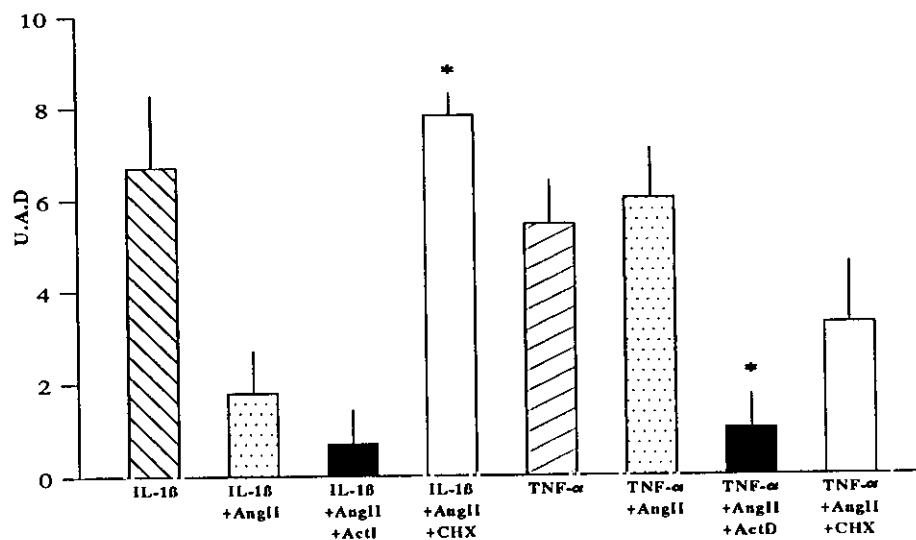
La inhibición de la síntesis *de novo* de proteínas, mediante la preincubación durante 1h con cicloheximida (CHX, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), revirtió la inhibición de la expresión del mRNA de la FN observado al coincubar la AngII y la IL-1 $\beta$  (figura 52). Esto sugiere que se requiere la síntesis de proteínas intermedias para inhibir la transcripción de este gen. Por el contrario, al coincubar AngII y TNF- $\alpha$  en presencia de CHX disminuyó la expresión de FN (figura 52). Estos resultados sugieren mecanismos moleculares diferentes en la regulación del mRNA de la FN por las combinaciones de AngII+IL-1 $\beta$  y AngII+TNF- $\alpha$ .



**Figura 50.** Efecto de la coincubación de AngII y citoquinas en la síntesis de FN liberada al sobrenadante y asociada a células. Las células fueron marcadas metabólicamente y se incubaron simultáneamente en presencia de cada citoquina, IL-1 $\beta$  (10U/ml) o TNF- $\alpha$  (100U/ml) y AngII ( $10^{-7}$  M) durante 24h, determinándose la producción de FN mediante inmunoprecipitación. (A) Autorradiografía representativa del análisis por electroforesis en PAGE-SDS de la FN soluble y asociada a células. (B) Cuantificación de los resultados de la FN total. Los datos están expresados como %incremento vs control (tomado como 100 en cada experimento) en unidades arbitrarias de densitometrado. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 5 experimentos, \*  $p < 0.05$  vs citoquina sola.



**Figura 51.** Efecto de la coincubación de AngII y citoquinas en la expresión del mRNA de la fibronectina en células mesangiales. Las células fueron coincubadas durante 24h con AngII ( $10^{-7}$ M) y con cada una de las citoquinas, IL1-β (10U/ml) o TNF-α (100U/ml). La figura muestra un Northern blot representativo de 3 realizados correspondiente a la hibridación con la sonda de FN. Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda.



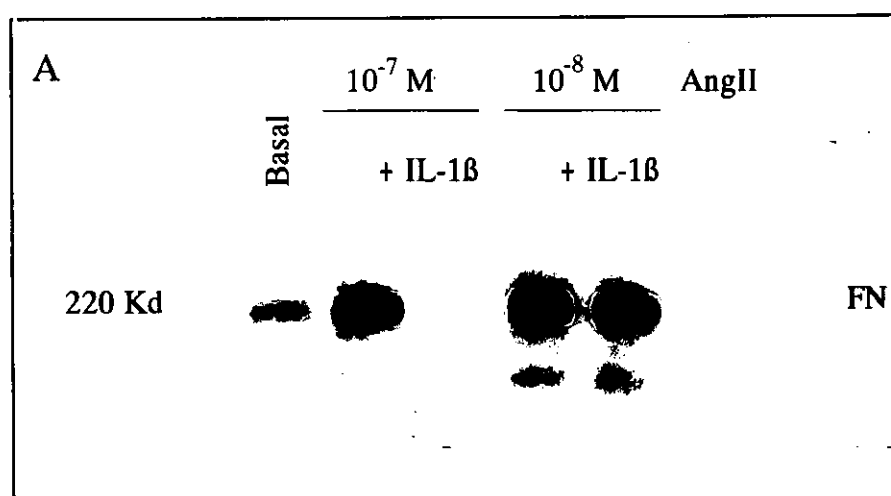
**Figura 52.** Efecto del tratamiento con cicloheximida y actinomicina D en la expresión génica de FN. Las células fueron preincubadas durante 1h con cicloheximida (CHX) o actinomicina D (Act D), entonces fueron estimuladas durante 24h con 10U/ml IL-1β o 100U/ml TNF-α en presencia o ausencia de  $10^{-7}$ M AngII. La figura muestra la cuantificación de las bandas, en unidades arbitrarias, corregidas por la cantidad total de RNA cargado y expresadas como n-veces de aumento vs control. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos, \*  $p < 0.05$  vs citoquina + AngII.

### 1.2.2.3. Estudio de los mecanismos de la interacción AngII e IL-1 $\beta$ en la síntesis de FN

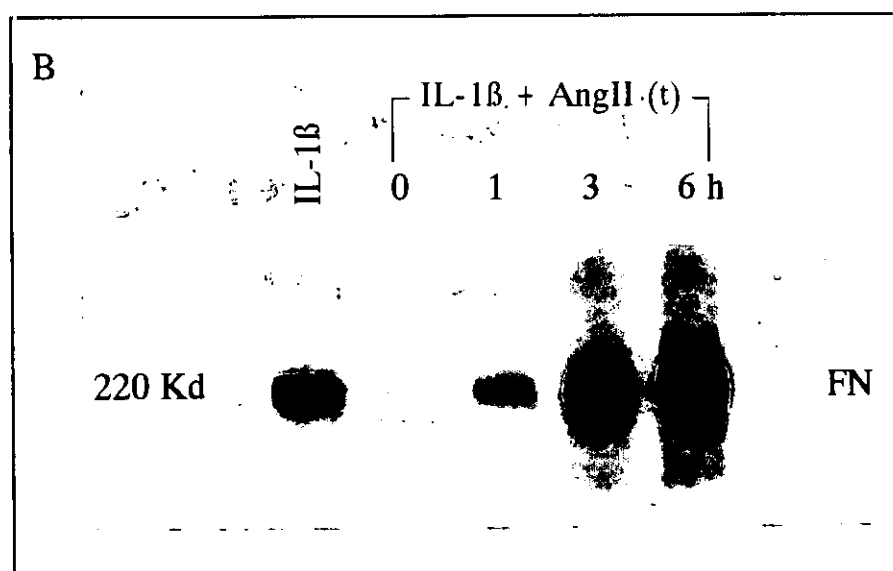
A continuación nos centramos en el estudio de los mecanismos moleculares de este fenómeno de la interacción AngII e IL-1 $\beta$  en la síntesis de FN. En primer lugar, determinamos el papel de la AngII en la síntesis de FN inducida por la IL-1 $\beta$ , estudiando la cinética, el efecto de distintas concentraciones de AngII y el tipo de receptor implicado en este proceso.

El efecto inhibitorio de la AngII sobre la producción de FN inducida por la IL-1 $\beta$  fue dependiente de la dosis de AngII. En la figura 53A observamos que, la dosis de  $10^{-7}$ M de AngII, presentó un mayor efecto inhibitorio en la síntesis de FN inducida por IL-1 $\beta$ , que la dosis de  $10^{-8}$ M.

Para observar este efecto inhibitorio fue necesaria la presencia de AngII en los primeros momentos tras la estimulación con IL-1 $\beta$  (figura 53B). La adición de AngII, 6 horas después de añadir la IL-1 $\beta$ , no tuvo efecto en la producción de FN inducida por esta citoquina.

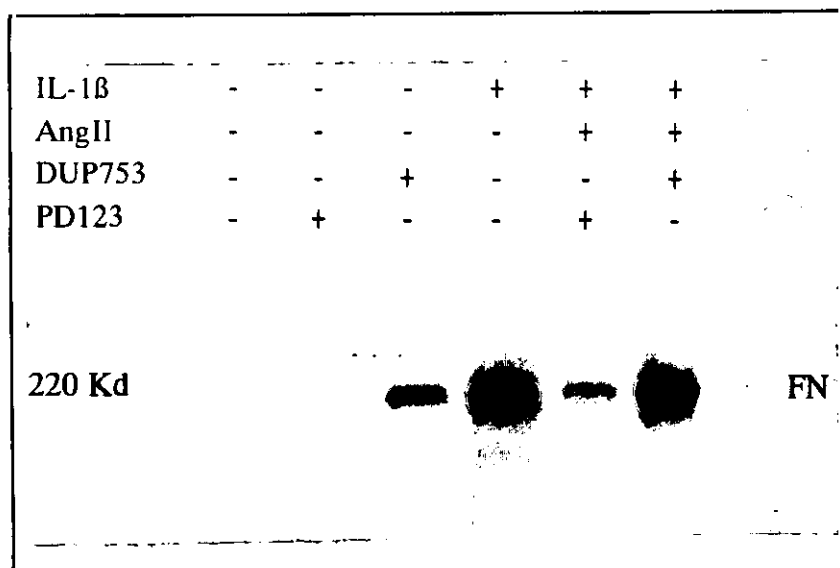


**Figura 53.** Efecto inhibitorio de la AngII sobre la síntesis de FN inducida por IL-1 $\beta$ . (A) Dosis dependencia. Las células fueron estimuladas durante 24h con 10U/ml IL-1 $\beta$  en presencia de dos concentraciones de AngII.



(B) Análisis cronológico de la acción inhibitoria de la AngII. Las células fueron estimuladas con 10U/ml IL-1 $\beta$  durante 24h; la AngII ( $10^{-7}$ M) fue añadida a la vez ó 1, 3 y 6 horas después de la estimulación con IL-1 $\beta$ . Las figuras muestran una autorradiografía representativa del análisis por electroforesis en PAGE-SDS de la FN soluble de 3 experimentos.

Para determinar el tipo de receptor de AngII implicado en el proceso, las células mesangiales se preincubaron durante 1h con un antagonista del receptor  $AT_1$ , el DUP753 ( $10^{-6}M$ ), o del receptor  $AT_2$ , el PD123177 ( $10^{-5}M$ ). En la figura 54, observamos que en presencia de DUP753, es decir, al bloquear la unión de la AngII al receptor  $AT_1$ , la desaparición del efecto inhibitorio de la AngII sobre la síntesis de FN inducida por la IL-1 $\beta$ , que no se produjo en presencia de PD123177. Estos resultados indican que el receptor  $AT_1$  es el responsable de este fenómeno inhibitorio.



**Figura 54.** Efecto de los antagonistas de los receptores  $AT_1$  y  $AT_2$  en la acción inhibitoria de la AngII. Las células fueron preincubadas con el antagonista del receptor  $AT_1$  ( $10^{-6}M$ , DUP753) y  $AT_2$  ( $10^{-5}M$  PD123177) durante 30 min y entonces estimuladas durante 24h con 10U/ml IL-1 $\beta$  sola o en combinación con  $10^{-7}M$  AngII. La figura muestra una autorradiografía representativa del análisis por electroforesis en PAGE-SDS de la FN soluble de 3 experimentos.

Estos resultados demuestran que al coincubar la AngII y la IL-1 $\beta$ , se produce una inhibición, por parte de la AngII, de la síntesis de FN inducida por la IL-1 $\beta$ , proceso mediado por el receptor  $AT_1$ . Este fenómeno también ocurre a nivel de la regulación de la expresión del mRNA de la FN inducido por la IL-1 $\beta$ . Además, hemos demostrado que para observar este efecto inhibitorio es necesaria la presencia de AngII en las primeras horas de la estimulación con IL-1 $\beta$ . Estos resultados sugieren que la AngII, al unirse al receptor  $AT_1$ , da lugar a una respuesta celular que produce la inhibición de la señal estimuladora de la IL-1 $\beta$  en la síntesis de FN. Por este motivo, el último punto que hemos abordado es el papel de la activación de algún segundo mensajero, estimulado por la AngII, que pudiera estar implicado en el bloqueo de la transducción de la señal de la IL-1 $\beta$ .

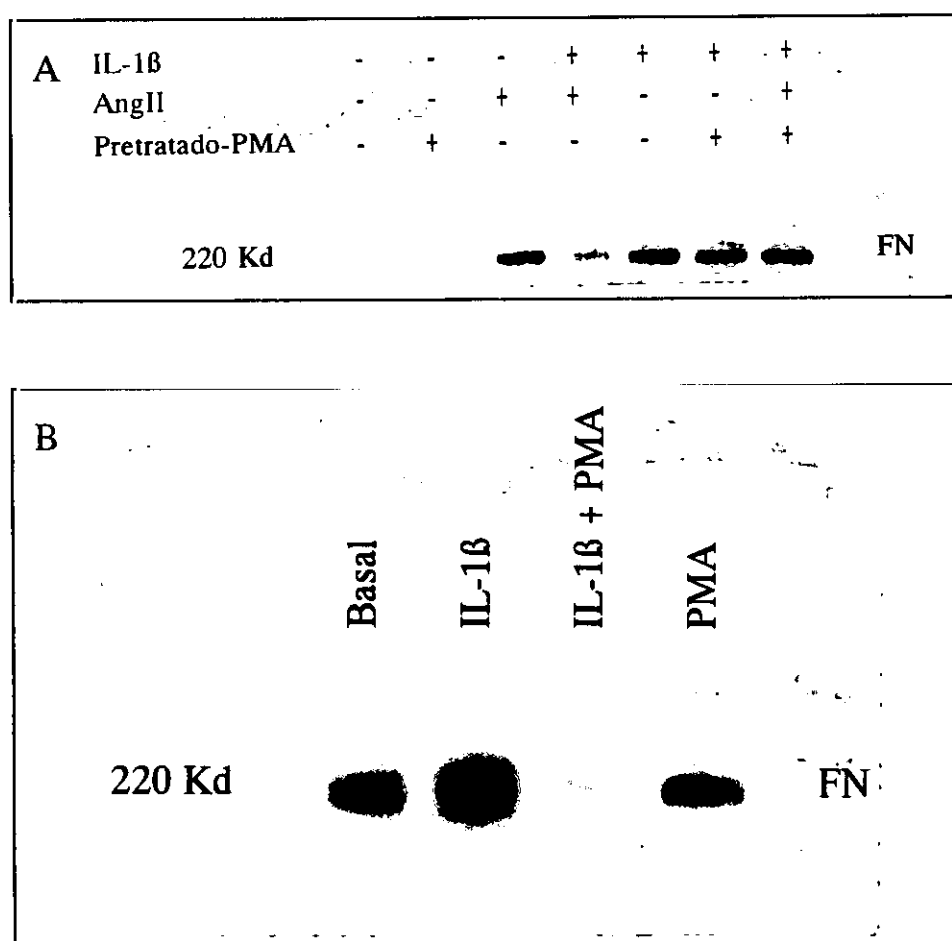
#### 1.2.2.4. Papel de la activación de la PKC en este fenómeno

La unión de la AngII al receptor  $AT_1$  desencadena una serie de respuestas intracelulares, entre las que destaca la activación de la PKC. En este trabajo (apartado 1.1.2.4), hemos demostrado que la AngII induce la síntesis de FN por un mecanismo dependiente de la activación de la PKC. Por ello estudiamos el papel de la PKC en este fenómeno inhibitorio, mediante la inhibición de su actividad por tratamiento prolongado con PMA (Gibbons et al., 1992). En segundo lugar, estudiamos el efecto de la estimulación directa de la PKC en la síntesis de FN inducida por IL-1 $\beta$ .

Las células mesangiales fueron incubadas durante 48h en medio con 0.5%STF en presencia de PMA ( $5 \times 10^{-7}M$ ), para eliminar la actividad de la PKC. En la figura 55A observamos que, en ausencia de actividad de PKC, el efecto inhibitorio de la AngII en la síntesis de FN inducida por IL-1 $\beta$  desaparece. Este resultado sugiere que la activación de la PKC participa en este fenómeno.

La coincubación de IL-1 $\beta$  y el ester de forbol PMA (100nM), agonista de la PKC, inhibió la síntesis de FN inducida por la IL-1 $\beta$  (figura 55B), de modo similar a la AngII. Este resultado confirma que la activación de la PKC participa en este proceso inhibitorio.

En conjunto, ambos experimentos demuestran que el efecto inhibitorio de la AngII en la síntesis de FN inducida por la IL-1 $\beta$  se produce mediante la activación de la PKC.



**Figura 55.** Papel de la PKC en la síntesis de FN inducida por IL-1 $\beta$ . (A) Efecto de la eliminación de la actividad de la PKC en la acción inhibitoria de la AngII. Las células fueron preincubadas con PMA ( $5 \times 10^{-7}M$ ) durante 48 h para eliminar la actividad de la PKC. Posteriormente, se estimularon con IL-1 $\beta$  (10 U/ml) y AngII ( $10^{-7}M$ ), cuantificándose la síntesis de FN al cabo de 24h.. (B) Efecto de la activación de la PKC por los esteres de forbol. Las células fueron estimuladas con 10U/ml IL-1 $\beta$  durante 24h en presencia de 100nM PMA. Las figuras muestran una autorradiografía representativa del análisis por electroforesis en PAGE-SDS de la FN soluble de 3 experimentos.



El mecanismo a través del cual la IL-1 $\beta$  induce la síntesis de FN se desconoce. Recientemente se ha descrito que en células mesangiales la IL-1 $\beta$  no activa la PKC (Kester et al., 1993). En este trabajo, hemos observado que la síntesis de FN inducida por IL-1 $\beta$  no se modifica en ausencia de actividad PKC (figura 55A). Estos datos sugieren que la síntesis de FN inducida por la IL-1 $\beta$  sigue un mecanismo independiente de la activación de PKC, diferente al observado para la AngII. Para profundizar en los mecanismos de transducción de la señal de la IL-1 $\beta$  en células mesangiales se requieren experimentos adicionales.

### 1.3. Estudio de la interacción AngII y fibroblastos intersticiales

Datos recientes sugieren que el sistema RAS juega un papel importante en la patogenia de la fibrosis intersticial renal (Kaneto et al., 1993; Egido, 1996). A pesar de que el fibroblasto intersticial es la principal célula responsable de la fibrosis en esta zona apenas existen estudios sobre la interacción de AngII y fibroblastos intersticiales renales. La infusión *in vivo* de AngII provoca cambios a nivel intersticial renal asociados con proliferación de células intersticiales, variaciones en su fenotipo y depósito de colágeno tipo IV con formación de fibrosis (Johnson et al., 1992). Recientemente, se ha demostrado que en la fibrosis cardíaca la AngII juega un papel importante en la activación de los fibroblastos cardíacos (Crabos et al., 1994). Por este motivo, el siguiente punto fue abordar el estudio de la caracterización molecular de la interacción de la AngII y los fibroblastos intersticiales renales, centrándonos en los fenómenos asociados con la fibrosis intersticial.

#### 1.3.1. Caracterización del receptor presente en los fibroblastos intersticiales renales

En fibroblastos intersticiales de conejo se ha determinado que la AngII se une a los receptores AT<sub>1</sub> (Fontoura et al., 1991). Por lo que en primer lugar determinamos si la línea celular NRK49F, fibroblastos intersticiales de rata, presentaba sitios de unión a AngII.

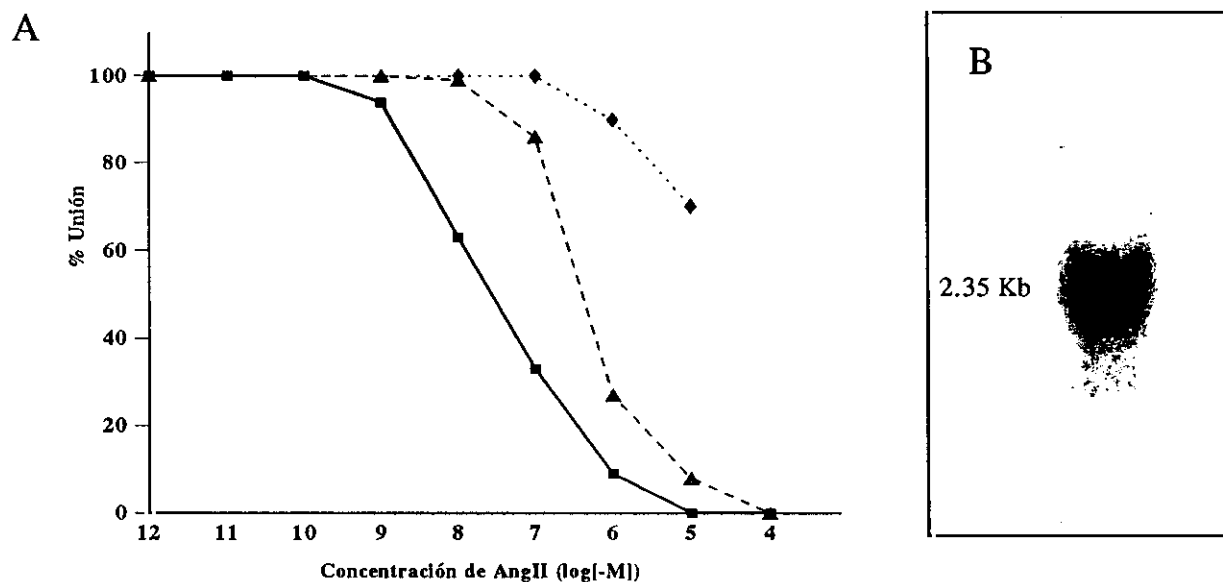
La unión de la AngII se realizó mediante el empleo de <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]AngII en células subconfluentes. La unión específica <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]AngII permaneció constante de 1 a 4 h. Como muestra la figura 56 la unión de <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]AngII se desplazó en presencia de AngII no marcada demostrando la existencia de una unión específica de la AngII.

Además, se realizó un estudio preliminar en las TFBs una línea celular de fibroblastos tubulointersticiales de ratón (Alvarez et al., 1992). Hemos observado la existencia de sitios de unión a AngII (datos no mostrados), lo que sugiere que la AngII puede interaccionar con varias líneas de fibroblastos renales de distinto origen.

El siguiente punto de nuestro estudio fue determinar el tipo de receptor presente en los fibroblastos renales (línea celular NRK49F). Para ello determinamos el desplazamiento de la unión de <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]AngII en presencia dos antagonistas específicos de los receptores de la AngII (el DUP753 del receptor AT<sub>1</sub>; el PD123177 del receptor AT<sub>2</sub>). Además, investigamos si este tipo celular expresa el mRNA del receptor AT<sub>1</sub>, mediante Northern blot .

Los fibroblastos se incubaron con <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>]AngII y concentraciones crecientes de DUP753 y PD123177, durante 3h a 10-15°C (figura 56A). El antagonista del receptor AT<sub>1</sub>, DUP753, desplazó al péptido marcado de manera similar a la AngII no marcada. La unión con el antagonista AT<sub>2</sub>, PD123177, no desplazó al péptido marcado, aunque a la concentración más alta (10<sup>-5</sup>M) se observó un ligero desplazamiento. Resultados similares han sido observados en fibroblastos cardíacos (Villareal et al., 1993), no quedando claro si es una competición específica o una reacción cruzada con el receptor AT<sub>1</sub>.

La figura 56B muestra un Northern blot del RNA total de fibroblastos. Las NRK49F expresan un transcrito de 2.35 kb correspondiente al mRNA del receptor  $AT_1$  clonado de células vasculares de músculo liso (Murphy et al., 1991), similar al observado en células mesangiales de rata (mostrado en el apartado 3 de Estudios *in vitro*).



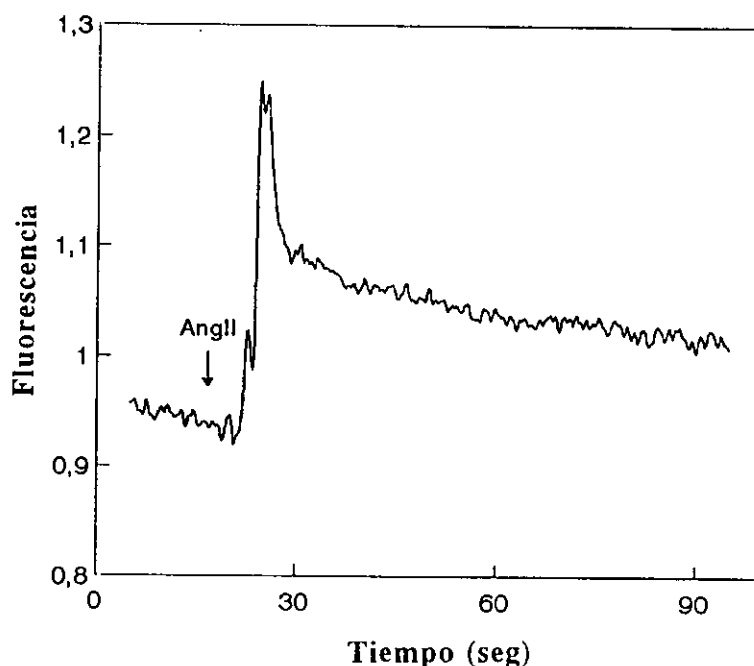
**Figura 56.** (A) Desplazamiento de la unión de  $^{125}I$ -[Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>]AngII en la línea celular NRK49F por AngII y dos antagonistas específicos de los receptores  $AT_1$  y  $AT_2$ . Los símbolos son (■) AngII, (▲) Dup753, (◆) PD123177. La figura muestra la media  $\pm$  DE de cuatro experimentos. (B) Northern blot representativo de la hibridación con el receptor  $AT_1$  de la AngII.

La línea celular NRK49F ha sido empleada anteriormente en diversos estudios. En cultivo en monocapa, el TGF- $\beta$  inhibe su crecimiento basal y en respuesta a EGF promueve el crecimiento independiente del anclaje en agar (Roberts et al., 1988), induce la expresión del receptor de EGF (Assoian et al., 1984) y aumenta la expresión del mRNA de colágenos y fibronectina (Ignatz et al., 1987). Cuando se introduce el gen de la renina mediante transfección génica estas células pueden sintetizar algunos de los componentes del RAS (Arai et al., 1995). Por estos motivos escogimos esta línea celular para los siguientes estudios. La línea celular murina TFBs ha sido empleada por el grupo de Neilson (Alvarez et al., 1992), estos autores han observado que la AngII no tiene efecto en la proliferación celular (en estudios no publicados citados en Wolf et al., 1993).

### 1.3.2. Señales intracelulares

La unión de la AngII a su receptor en la superficie celular desencadena la liberación de segundos mensajeros que transmiten la información al interior de la célula. Uno de los fenómenos comunes producido en diversas células por la AngII es el aumento de calcio intracelular, como ocurre en células mesangiales (Mené et al., 1989), en fibroblastos cardíacos (Cabros et al., 1994) y en células epiteliales tubulares (Wolf et al., 1991), aunque la respuesta varía de unas células a otras. En primer lugar, estudiamos si los fibroblastos intersticiales respondían de manera similar tras la estimulación con AngII.

Las variaciones en las concentraciones de calcio intracelular se determinaron por la medida continua de la intensidad de fluorescencia. Las células fueron marcadas con una sonda fluorescente, fura-2/AM, cuantificando la relación de emisión de fluorescencia en respuesta a la estimulación con AngII ( $10^{-6}$ M). Como se muestra en la figura 57, la AngII aumentó la concentración de calcio intracelular en los fibroblastos intersticiales renales, sugiriendo un mecanismo común a otros tipos celulares.



**Figura 57.** *Movilización de calcio en fibroblastos estimulados con AngII.* Las células fueron cargadas con fura-2 y estimuladas con  $10^{-6}$ M AngII. Los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  se determinaron por variaciones en la intensidad de fluorescencia.

### 1.3.3. Efectos metabólicos relacionados con el crecimiento y la matriz extracelular

Una de las características del daño renal es la proliferación de fibroblastos intersticiales y el acúmulo de proteínas de matriz en el intersticio, debido probablemente al efecto de citoquinas y factores de crecimiento liberadas localmente (revisado en Strutz, 1995). Por ello nos planteamos estudiar si la interacción de la AngII con los fibroblastos intersticiales renales podría ser uno de los factores implicados en el desarrollo de la fibrosis intersticial renal.

#### *1.3.3.1. Demostración de que la AngII es un factor de crecimiento*

En primer lugar abordamos la hipótesis de que la AngII pudiera ser considerada como un factor de crecimiento para los fibroblastos intersticiales. Para ello estudiamos el efecto de la AngII en la proliferación celular (método del azul de metileno), en el ciclo celular (citometría de flujo), y en la expresión de genes relacionados con el crecimiento celular, como el gen de respuesta temprano c-fos (Northern blot).

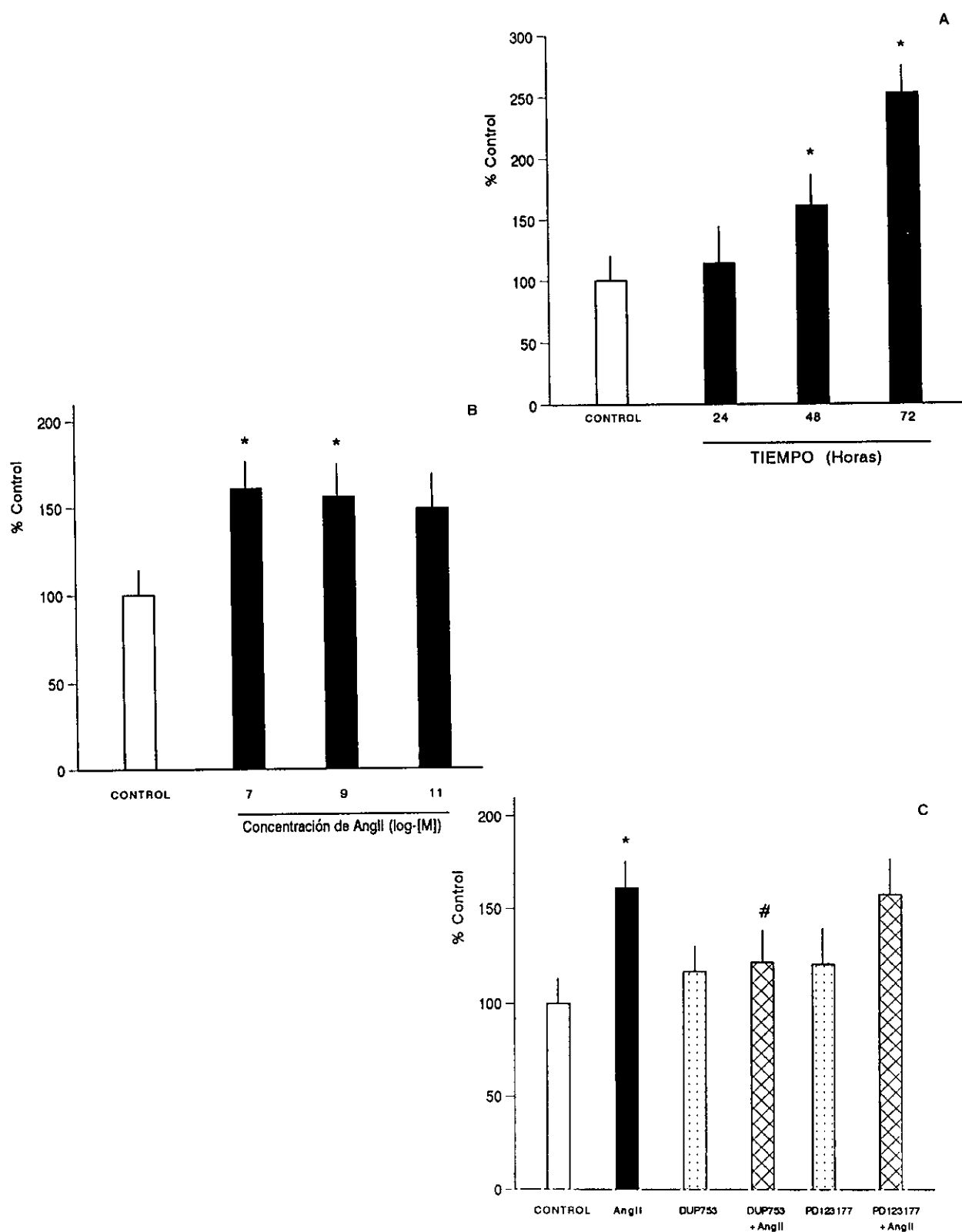
Los fibroblastos intersticiales renales fueron estimulados con diversas dosis de AngII (rango de  $10^{-7}$  a  $10^{-11}$  M) durante 24, 48 y 72 h en un medio libre de suero, para evitar la degradación de AngII y el efecto de factores contenidos en el suero. La proliferación celular se cuantificó mediante el ensayo de azul de metileno. Como podemos observar en la figura 58 A y B, la AngII tiene un efecto mitogénico tiempo y dosis dependiente. Después de 48h de incubación con AngII ( $10^{-7}$ M), se observó un aumento significativo en la proliferación celular ( $187 \pm 12\%$  sobre el control;  $p < 0.05$ ), aunque la magnitud de este aumento es del 30% con respecto a lo observado en respuesta al 5%STF.

Hemos determinado el tipo de receptor implicado en este proceso. Los fibroblastos se preincubaron durante 30 min con un antagonista del receptor  $AT_1$  de la AngII, el DUP753 ( $10^{-6}$ M), y con otro del receptor  $AT_2$ , el PD123177 ( $10^{-6}$ M), y posteriormente se estimularon con  $10^{-7}$ M AngII durante 48 h. En presencia del DUP753 se observó una inhibición del 70% en la proliferación celular inducida por la AngII. Por el contrario, el PD123177 no tuvo efecto (figura 58C). Estos datos demuestran que este aumento en la proliferación celular se produce a través de la unión al receptor  $AT_1$ .

Mediante análisis por citometría de flujo (FACS) se cuantificó la variación del ciclo celular inducida por la AngII. Las células fueron mantenidas durante 48h en medio sin suero, para obtener el estado de reposo ( $G_0$ ). Al estimular con AngII ( $10^{-7}$ M) durante 24h observamos un mayor porcentaje de células en estado de mitosis ( $S+G_2/M > G_0/G_1$ ) (figura 59). El tamaño celular, determinado por FACS, no varía en respuesta a la estimulación con AngII (Control =  $20 \pm 10$ ; AngII =  $24 \pm 11$ ; canal principal  $\pm$  coeficiente de variación) (figura 59B). Estos datos demuestran que la AngII, al actuar sobre fibroblastos renales en reposo, en fase  $G_0$ , los activa, entran en  $G_1$  y progresan a la fase S. Estos resultados junto con los observados por el método del azul de metileno, confirman que la AngII es un agente mitogénico para los fibroblastos intersticiales renales.

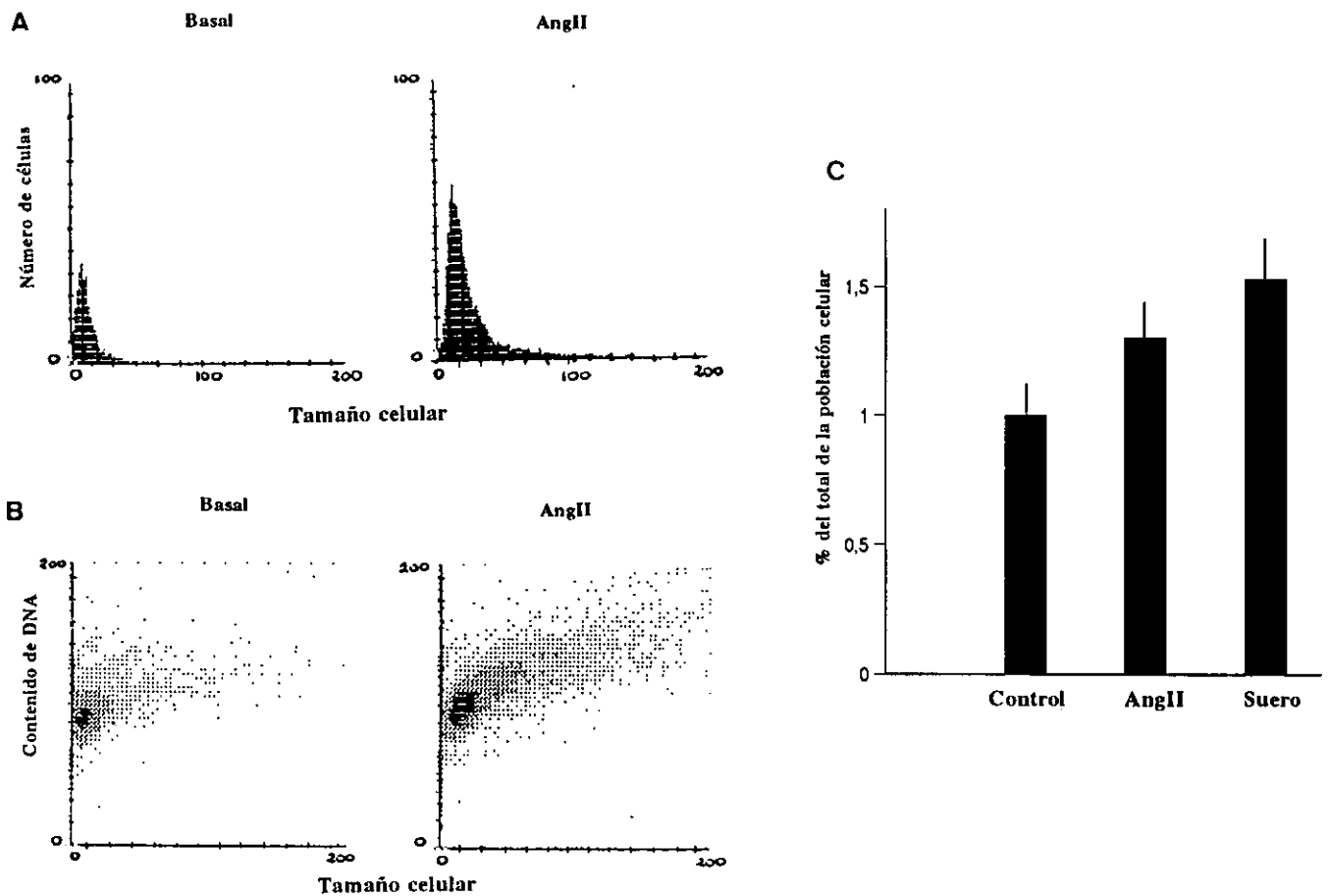
La inducción del gen de respuesta temprano c-fos se ha relacionado con respuestas proliferativas a largo plazo, normalmente precede a la proliferación celular (Tsuda et al., 1986). La proteína c-fos forma parte del complejo AP-1 que se une a los elementos del control de la transcripción de algunos genes, por lo que se le ha considerado como un factor regulador de la transcripción (Rauscher et al., 1988). Estudios previos han demostrado que la AngII induce la expresión de c-fos en células mesangiales y fibroblastos cardíacos. Además, la infusión *in vivo* de AngII induce la expresión de c-fos en la corteza y en la médula renal (Saltis et al. 1991; Rosenberg et al., 1993). Los fibroblastos intersticiales renales fueron estimulados durante 1h con AngII ( $10^{-7}$  M). Pasado el tiempo de incubación se extrajo el RNA y se analizó la expresión del mRNA de c-fos mediante Northern blot. En la figura 60 observamos que la AngII indujo la expresión de c-fos, mientras que este gen no aparece en las células en estado de reposo ( $G_0$ ).

Todos estos resultados demuestran que la AngII interacciona con los fibroblastos intersticiales, activando respuestas a corto y largo plazo relacionadas con un aumento en la proliferación celular. Además, apoyan la hipótesis de que la AngII es un factor de crecimiento para este tipo celular.

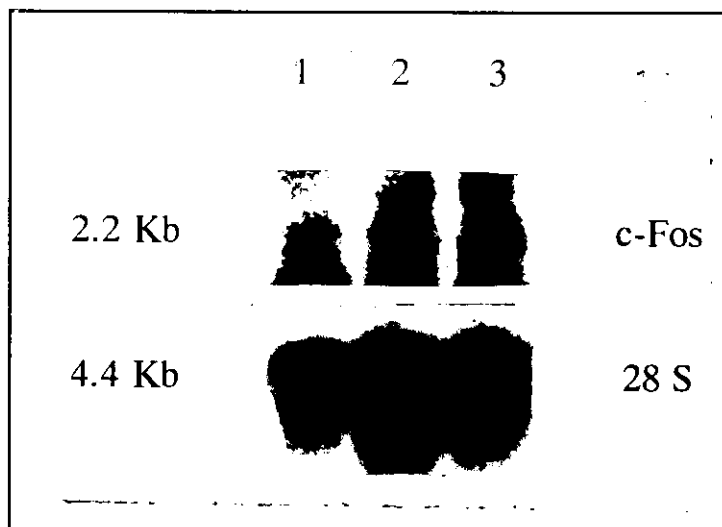


**Figura 58.** Efecto de la AngII sobre la proliferación de fibroblastos intersticiales renales. (A) Tiempo-respuesta. Los fibroblastos fueron incubados con AngII ( $10^{-7}$ M) durante 24, 48 y 72h en ausencia de STF. (B) Dosis-respuesta a las 48h de incubación. (C) Efecto de los antagonistas de los receptores de  $AT_1$  (DUP753) y  $AT_2$  (PD123319) de la AngII en la proliferación inducida por la AngII. La proliferación celular se determinó mediante ensayo colorimétrico de azul de metileno. Los resultados se expresan como %incremento vs control (el cual se tomó como 100 en cada experimento). Media  $\pm$  EEM de 4 experimentos realizados por triplicado, \* $p < 0.05$  vs control, # $p < 0.05$  vs AngII sola.





**Figura 59.** Efecto de la AngII en el tamaño celular y en el contenido de DNA. Las células fueron estimuladas con  $10^{-7}$ M AngII durante 24h, entonces fueron teñidas con ioduro de propidio y tratadas con RNAsa y analizadas por FACS. El histograma (A) muestra la relación entre el tamaño celular (eje x) y número de células (eje y). La figura (B) refleja el contenido de DNA celular (eje x) y el tamaño de las células (eje y). (C) Análisis por FACS de los cambios en la fase S y en la fase Go/Gi en respuesta a AngII. Como control positivo se utilizó 5%STF. Los resultados se expresan como canal principal  $\pm$  coeficiente de variación y son la media de 3 experimentos.



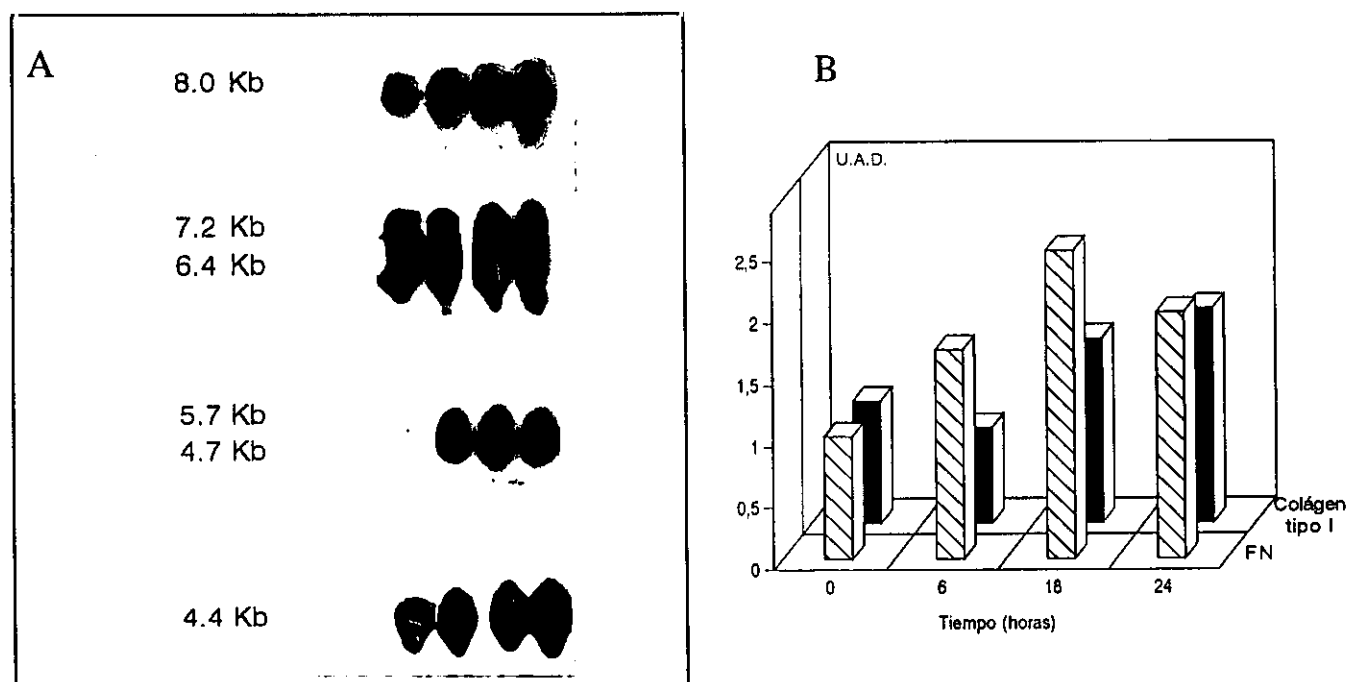
**Figura 60.** La AngII induce la expresión del mRNA de c-fos en fibroblastos intersticiales renales. Los fibroblastos, en estado de reposo, fueron incubadas con AngII durante 1h. La figura muestra un Northern blot representativo de 2 realizados. Línea 1 (Basal), línea 2 ( $10^{-7}$ M AngII). Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda.

### 1.3.3.2. Efecto de la AngII en la síntesis de proteínas de matriz extracelular

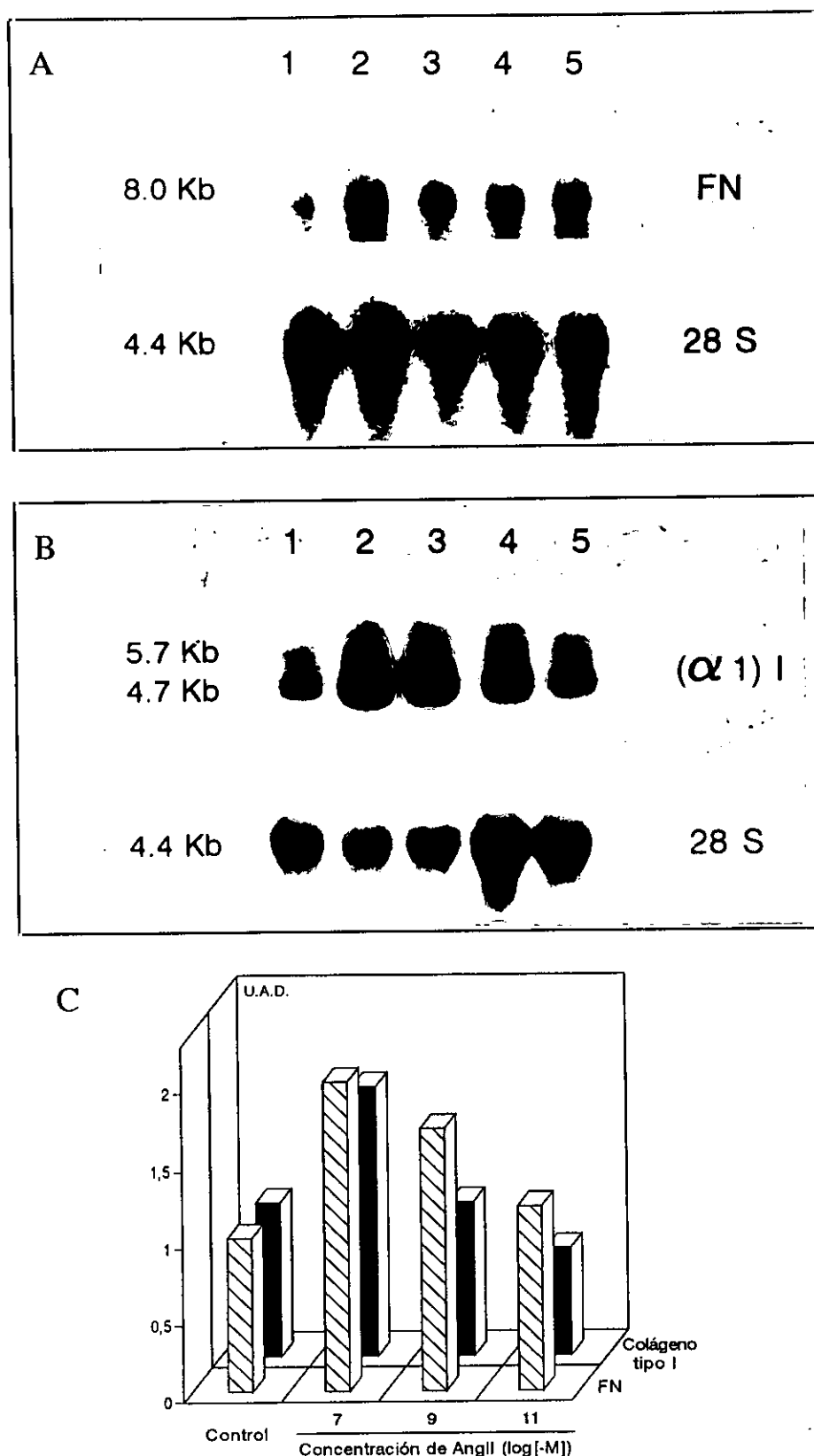
En segundo lugar abordamos la hipótesis de que la AngII pudiera estimular la expresión y síntesis de proteínas de matriz extracelular en los fibroblastos intersticiales.

Los fibroblastos fueron estimulados con distintas dosis de AngII. Pasado el tiempo de incubación se extrajo el RNA y se analizó la expresión de proteínas de matriz mediante técnicas de Northern blot. La AngII indujo un aumento en la expresión del mRNA de la FN y del colágeno intersticial tipo I con un máximo de expresión con la dosis de  $10^{-7}$ M (2,5 y 1,5-veces incremento vs basal, al cabo de 18 y 24h de incubación respectivamente) (figuras 61 y 62). Por el contrario no tuvo efecto sobre los niveles del colágeno tipo IV, poco expresado en este tipo celular (figura 61A).

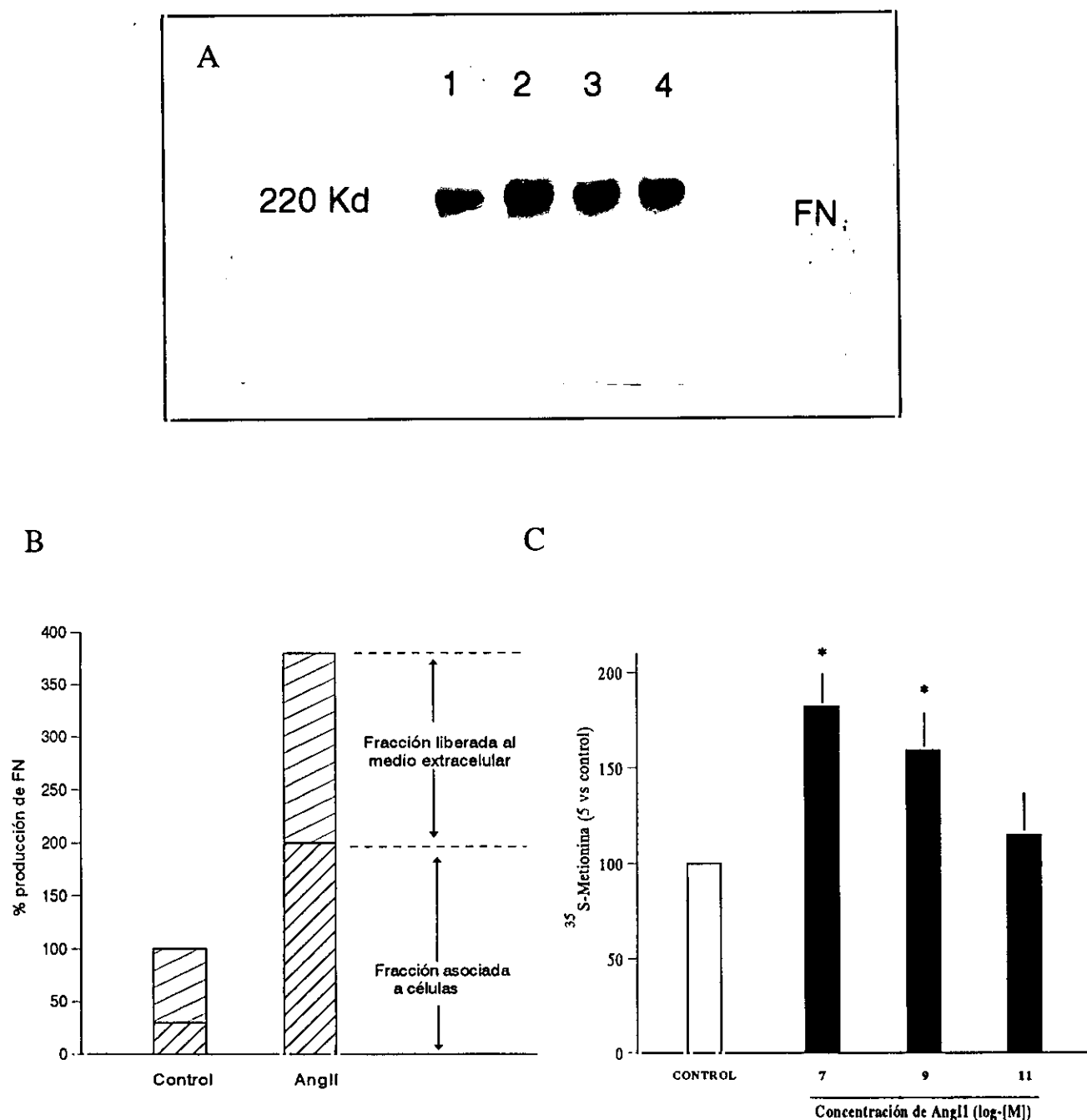
Los fibroblastos fueron marcados metabólicamente con  $^{35}$ S-Metionina y se incubaron durante 24h con AngII, en un medio libre de suero, cuantificando la síntesis *de novo* de FN mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-FN y posterior análisis por electroforesis en PAGE-SDS. Basalmente la mayor parte de la FN producida por los fibroblastos es secretada al medio extracelular (70% del total). En respuesta a la estimulación con AngII aumentó la producción de FN soluble y asociada a células, de manera dosis dependiente (figura 63 A y B). Además, varió la proporción de FN soluble/asociada a células, aumentando la contribución de la fibronectina celular (figura 63C). Estos resultados sugieren que la AngII estimula a los fibroblastos intersticiales contribuyendo al depósito de matriz observado en los procesos de fibrosis renal.



**Figura 61.** Tiempo-respuesta del efecto de la AngII en la expresión de proteínas de matriz extracelular en fibroblastos intersticiales renales. Los fibroblastos se estimularon con AngII ( $10^{-7}$ M) durante 6, 18 y 24h. La figura A muestra un Northern blot representativo de 2 realizados, correspondiente a la hibridación con las sondas de FN, colágenos tipo VI ( $(\alpha 1)$ IV) y tipo I ( $(\alpha 1)$ I) y 28S. Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda. (B) Cuantificación de las bandas. Los resultados están expresados, en unidades arbitrarias de densitometrado, como n-veces de aumento respecto al basal.



**Figura 62.** Dosis-respuesta del efecto de la AngII en la expresión de fibronectina y colágeno tipo I. Las células fueron incubadas durante 24h con AngII (dosis de  $10^{-7}$  a  $10^{-11}$ M). Northern blot representativo de 2 realizados, correspondiente a la hibridación con las sondas de FN (A) y colágeno tipo I ((α1)I) (B). Línea 1 (Basal), líneas 2-5 (dosis de AngII;  $2 \cdot 10^{-7}$ M,  $3 \cdot 10^{-8}$ M,  $4 \cdot 10^{-9}$ M,  $5 \cdot 10^{-10}$ M). Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda. (C) Cuantificación de las bandas. Los resultados están expresados, en unidades arbitrarias de densitometrado, como n-veces de aumento respecto al basal.

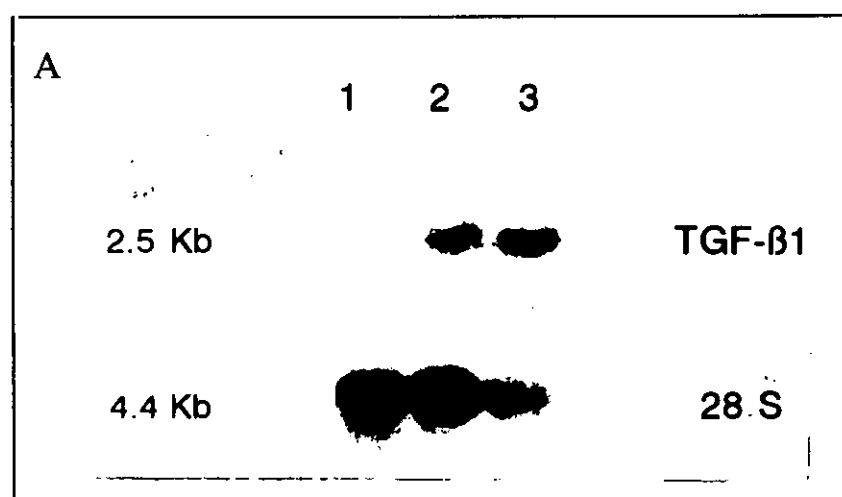


**Figura 63.** Efecto de la AngII en la síntesis de FN en fibroblastos intersticiales renales. Las células se marcaron metabólicamente y se incubaron durante 24h con AngII. (A) Autorradiografía representativa del análisis por PAGE-SDS de la FN soluble. Línea 1 (Basal), línea 2 ( $10^{-7}$ M AngII), línea 3 ( $10^{-8}$ M AngII). (B) Relación de la FN soluble-asociada a células producida por la AngII. (C) Dosis respuesta de AngII. Los resultados están expresados, en unidades arbitrarias de densitometrado, como % de producción de FN respecto al basal (el cual se tomó en cada experimento como 100). Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos, \* $p < 0.05$  vs basal.

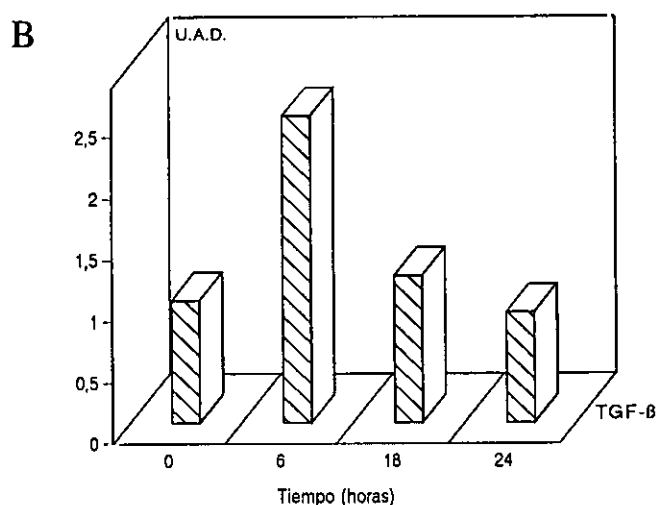
### 1.3.3.3. Efecto de la AngII en la expresión de factores de crecimiento

Como hemos visto anteriormente, el TGF- $\beta$  es el principal factor de crecimiento relacionado con la regulación de la matriz. En este trabajo hemos demostrado que está implicado en la síntesis de FN inducida por la AngII en células mesangiales (apartado 1.1.2.3) y que su expresión se encuentra elevada en la corteza renal de ratas con nefritis (ver página 58). Todo esto nos llevó a determinar si la AngII induce un aumento en la expresión del mRNA del TGF- $\beta$  en los fibroblastos intersticiales.

La incubación con AngII ( $10^{-7}$ M) y posterior análisis por Northern blot, demostró un aumento en la expresión del mRNA del TGF- $\beta$ 1 máximo a las 6h de incubación (2,3-veces) y que retornó a niveles basales al cabo de 24 h (figura 64). Este resultado sugiere que este factor de crecimiento podría estar implicado en el efecto de la AngII en la síntesis de proteínas matriz en los fibroblastos intersticiales renales, como ocurre en otros tipos celulares.



**Figura 64.** Efecto de la AngII en la expresión del mRNA de TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos intersticiales renales. La figura A muestra un Northern blot representativo de 2 realizados. Las células se incubaron con AngII ( $10^{-7}$ M) durante 6h. Línea 1 (Basal), línea 2 (AngII). Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda.



**(B)** Tiempo-respuesta, cuantificación de las bandas. Los resultados están expresados, en unidades arbitrarias de densitometrado, como n-veces de aumento respecto al basal.

En conjunto, estos resultados demuestran que la AngII interacciona con los fibroblastos intersticiales renales dando lugar a un aumento en su proliferación y en la síntesis de factores de crecimiento y proteínas de matriz extracelular. Estos datos apoyan la hipótesis de que la AngII puede contribuir al desarrollo de la fibrosis renal en situaciones asociadas a un aumento en la concentración local de AngII.

## 2. PAPEL DE LA ANGII EN EL RECLUTAMIENTO CELULAR

Las enfermedades renales evolutivas se caracterizan por la presencia de células inflamatorias, en particular monocitos y linfocitos, en el área glomerular e intersticial. En este trabajo, hemos demostrado que en un modelo de nefritis inmune el tratamiento con un iECA disminuye el infiltrado en ambas zonas (ver páginas 43 y 47). Una de las hipótesis que explican el aumento del infiltrado tisular es la liberación, por parte de las células residentes, de sustancias con actividad quimioattractante para las células circulantes. En este sentido, hemos observado un aumento en la expresión en la corteza renal del MCP-1 que coincide con el máximo infiltrado y que disminuye en respuesta al tratamiento con quinapril (ver página 62). Estos hechos nos llevaron a abordar la hipótesis de que la AngII podía participar en el reclutamiento celular induciendo la síntesis de factores quimiotácticos en células renales.

El objetivo del siguiente apartado ha sido estudiar el efecto en células mesangiales y en monocitos circulantes de la AngII y de su producto de degradación, la AngIII, en la expresión de sustancias con actividad quimiotáctica, de la familia de las intercrinas, como el MCP-1 y el IP-10, o no relacionadas como la ciclofilina B (CyB).

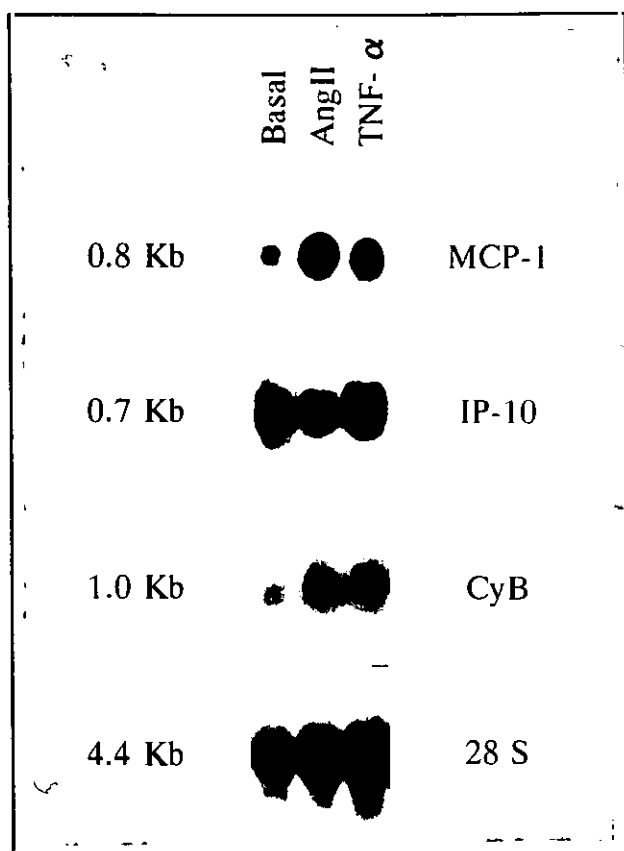
Recientemente se ha demostrado que la AngII induce la síntesis de IL-6 en células mesangiales murinas (Moriyama et al., 1995). El promotor del gen de diversas citoquinas, entre las que cabe destacar la IL-6 y el MCP-1, es un sitio de unión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, pero se desconoce si la AngII induce la activación de este factor nuclear. Por lo que en segundo lugar abordamos el estudio de la activación del factor NF- $\kappa$ B, determinando si participa en el control de la regulación de la expresión génica de alguna citoquina inducida por la AngII.

### 2.1. Expresión de sustancias quimiotácticas en células mesangiales

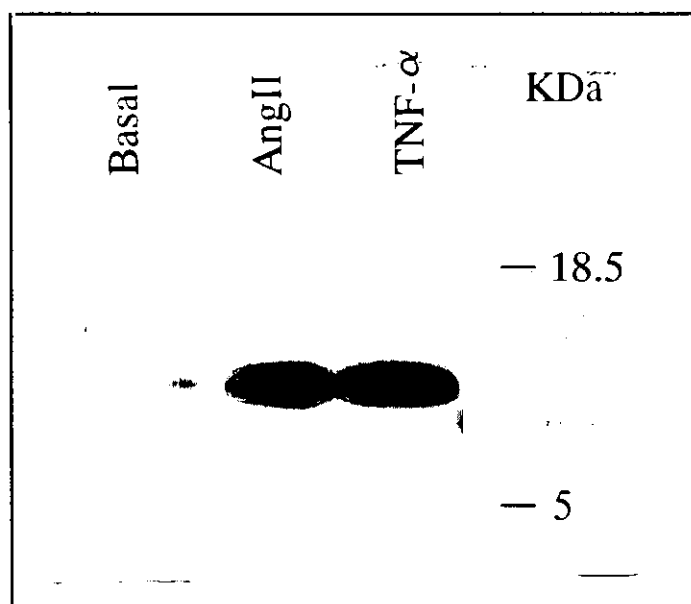
Las células mesangiales son capaces de sintetizar sustancias quimiotácticas en respuesta a estímulos como el LPS o el TNF- $\alpha$  (Satriano et al., 1993), pudiendo contribuir al reclutamiento de células circulantes. Estudios realizados por nuestro grupo, han demostrado que el LPS y TNF- $\alpha$  inducen un aumento en la expresión de IP-10 en células mesangiales (Gómez-Chiarri et al., 1993). Además, hemos observado que una citoquina que pertenece a la familia del TNF- $\alpha$ , el FAS, induce un aumento en la expresión de MCP-1 (González-Cuadrado et al., 1996). Por lo que nos planteamos estudiar el efecto de la AngII en la expresión de sustancias quimioattractantes en este tipo celular.

Las células mesangiales fueron estimuladas con distintas dosis de AngII (rango desde  $10^{-7}$  a  $10^{-11}$  M) durante 3, 6 y 24h. Pasado el tiempo de incubación se extrajo el RNA y se analizó la expresión de sustancias quimiotácticas mediante Northern blot. La cinética de este proceso es similar a la inducida por el LPS o el TNF- $\alpha$ , observándose un máximo de incremento tras 6h de estimulación, que retornó a los niveles basales al cabo de 24h. La estimulación con AngII ( $10^{-7}$ M) durante 6h indujo un aumento en la expresión del mRNA del MCP-1, comparable al TNF- $\alpha$  (100U/ml) (2,7-veces incremento vs basal, respectivamente). También aumentó la expresión del gen de la CyB (2-veces). Por el contrario, la AngII no modificó la expresión del IP-10 (figura 65).





**Figura 65.** Efecto de la AngII en la expresión del mRNA de sustancias quimiotácticas en células mesangiales. Las células fueron incubadas durante 6 h con AngII ( $10^{-7}$ M). Finalizada la incubación, se extrajo el RNA y se sometió a electroforesis y transferencia. La figura muestra un Northern blot representativo de 3 realizados, correspondiente a la hibridación con las sondas de MCP-1, IP-10 y CyB. Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda.



**Figura 66.** Producción de MCP-1 por células mesangiales estimuladas con AngII. Las células se incubaron durante 24h con  $10^{-7}$ M AngII en presencia de 0.5%STF. El medio condicionado se concentró 10 veces, cuantificándose la síntesis de MCP-1 mediante Western Blot con anticuerpo anti-MCP-1. Como control positivo se utilizó TNF- $\alpha$  (100U/ml). La posición de los marcadores de masa molecular está indicada en KDa. La banda principal que corresponde al MCP-1 se indica a 12-14 KDa.

## 2.2. Síntesis de MCP-1

El siguiente objetivo fue determinar si el aumento en la expresión de MCP-1 observado en respuesta a la AngII se traducía en la liberación de proteína al medio extracelular. Las células fueron incubadas con AngII ( $10^{-7}$ M) durante 24 h, cuantificando en el sobrenadante celular la síntesis de MCP-1 mediante Western blot. En condiciones basales se observó una banda de 12-14KDa

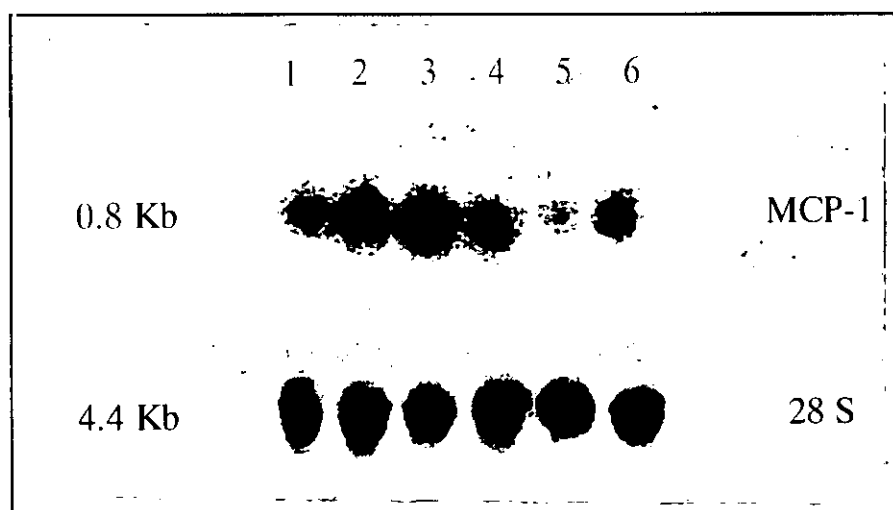
correspondiente a la masa molecular del MCP-1 (figura 66), que aumentó en respuesta a la estimulación con AngII y TNF- $\alpha$ .

Estos resultados muestran que la AngII al actuar sobre las células residentes renales induce la expresión y síntesis de factores como el MCP-1, quimiotácticos para las células circulantes, pudiendo por tanto contribuir al reclutamiento celular a nivel tisular.

### 2.3 Regulación del gen del MCP-1

En este trabajo hemos demostrado que algunos de los fenómenos inducidos por la AngII en células mesangiales, como el aumento en la expresión de TGF- $\beta$ 1 y la síntesis de FN, siguen un mecanismo dependiente de la activación de la PKC. Además, sustancias agonistas de la PKC, como esteroides de forbol, inducen un aumento en la expresión del gen del MCP-1. Por tanto estudiamos la participación de la PKC en la expresión de MCP-1 inducida por AngII. La preincubación durante 1h con estaurosporina ( $10^{-5}$ M) mostró una disminución del 80% en el aumento del mRNA del MCP-1 inducido por la AngII (figura 67), lo que sugiere un mecanismo dependiente de la PKC en el efecto de la AngII en la expresión del MCP-1.

La inhibición de la síntesis *de novo* de proteínas, mediante la preincubación durante 1h con cicloheximida (CHX,  $1\mu\text{g/ml}$ ), dió lugar a la superinducción de la expresión del mRNA del MCP-1 inducido por la AngII (figura 67), lo que sugiere que se requiere la existencia de una proteína represora lábil encargada quizás de mantener unos niveles bajos de expresión de este gen. El efecto de la CHX en la expresión del TGF- $\beta$ 1 inducido por la AngII en células de músculo liso vascular (Itoh et al., 1993), y por el PAF en células mesangiales sugieren mecanismos moleculares diferentes en la regulación del mRNA del MCP-1 y del TGF- $\beta$ 1, a pesar de un mecanismo común a través de la activación de la PKC.



**Figura 67.** Regulación de la expresión del MCP-1 inducida por la AngII en células mesangiales. Las células fueron preincubadas durante 1h con estaurosporina ( $10^{-5}$ M) o CHX ( $1\mu\text{g/ml}$ ) y posteriormente estimuladas con AngII ( $10^{-7}$ M) durante 6 h. La figura muestra un Northern blot representativo de 2 realizados correspondientes a la hibridación con la sonda de MCP-1. Línea 1 (Basal), línea 2 (AngII), línea 3 (CHX), línea 4 (CHX + AngII), línea 5 (Estau + AngII), línea 6 (Estau). Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda.

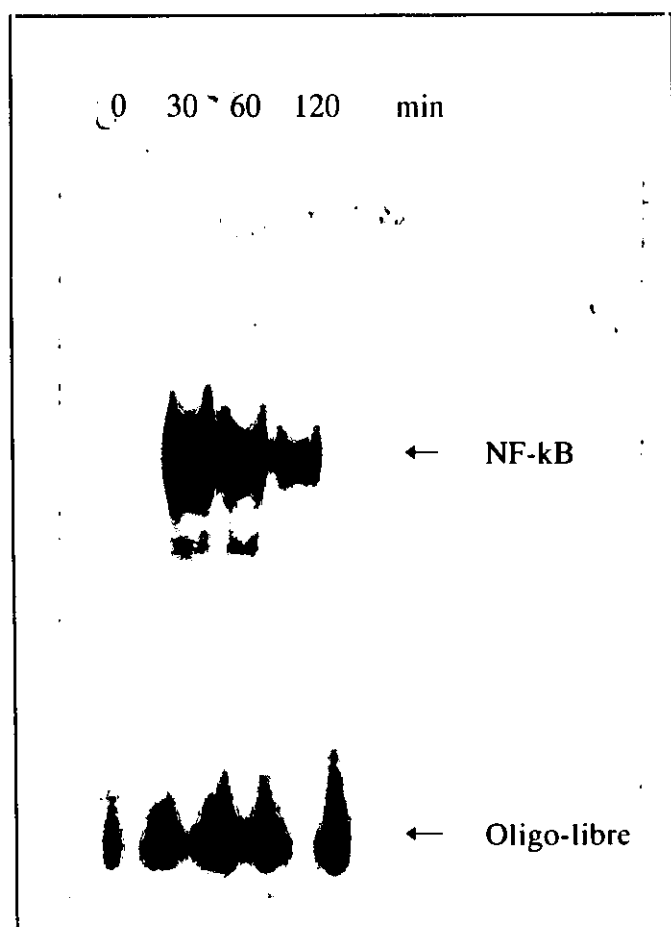
## 2.4. Papel de la activación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B en la expresión del MCP-1 inducida por la AngII.

El NF $\kappa$ B es el principal factor implicado en la transcripción del gen del MCP-1 inducido por la IL-1 $\beta$  (Rovin et al., 1995), el TNF- $\alpha$  y el PMA (Ueda 1994). Por tanto, el siguiente objetivo de nuestro estudio fue determinar si el aumento en la expresión del MCP-1 inducido por la AngII está mediado por la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

### 2.4.1. Activación del factor de transcripción NF-KB en respuesta a la estimulación con AngII.

Las células fueron incubadas con AngII desde 30min a 2h; pasado este tiempo se obtuvieron los extractos nucleares y se determinó la actividad del NF- $\kappa$ B mediante un ensayo de unión de las proteínas nucleares a un oligoconsenso marcado con  $\gamma$ - $^{32}$ P y el análisis en gel de retardo de movilidad electroforética (EMSA).

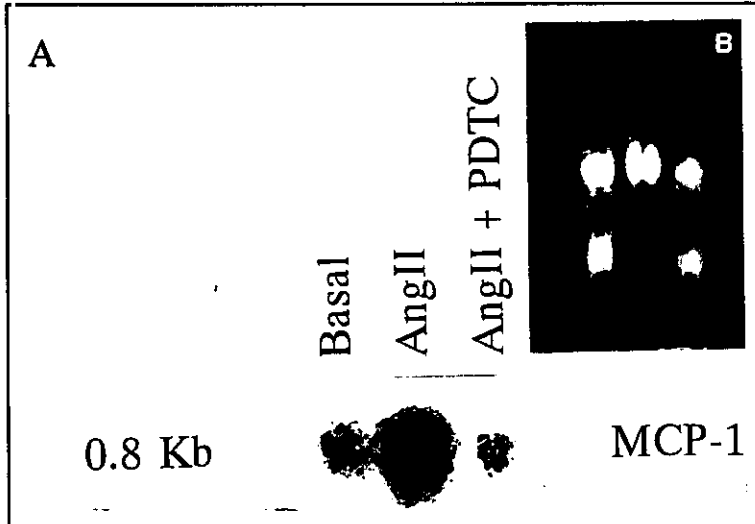
La AngII ( $10^{-7}$ M) activa al factor nuclear NF- $\kappa$ B de modo similar al LPS ( $1\mu\text{g/ml}$ ) y al TNF- $\alpha$  ( $100\text{U/ml}$ ). La máxima activación del NF $\kappa$ B ocurrió al cabo de 30 minutos, desapareciendo a las 2h (figura 68). Este efecto es específico ya que en presencia de oligo frío en exceso (50 veces) se inhibió la unión del complejo activado a la secuencia del NF- $\kappa$ B (ensayo de competición) (datos no mostrados).



**Figura 68.** Efecto de la AngII en la actividad del factor nuclear NF- $\kappa$ B. La figura muestra un experimento representativo de un ensayo de movilidad electroforética para el NF- $\kappa$ B activado en respuesta a AngII. Las células fueron incubadas con  $10^{-7}$ M de AngII determinándose la activación del NF- $\kappa$ B desde 0 a 2h. La posición del complejo NF- $\kappa$ B y del oligonucleotido libre están indicadas.

### 2.4.2. Participación de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en la expresión del mRNA del MCP-1 inducido por la AngII.

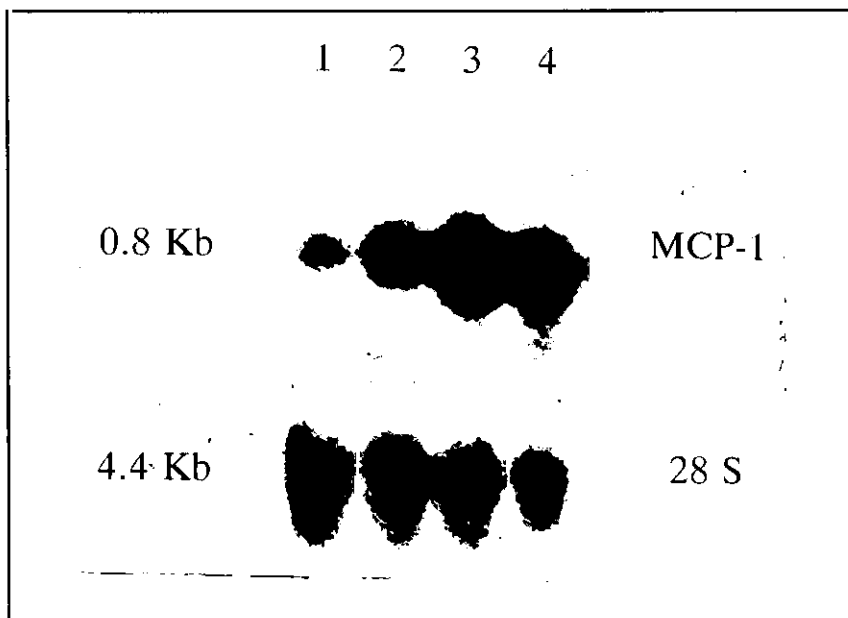
Para determinar el papel del NF $\kappa$ B en la expresión del MCP-1 inducida por la AngII, las células mesangiales fueron incubadas con PDTC (200 $\mu$ M), un inhibidor de la activación del NF- $\kappa$ B (Schreck et al., 1992), durante 1h antes de la adición de AngII (10<sup>-7</sup>M). La expresión del MCP-1 fue completamente inhibida en presencia de PDTC (figura 69), sugiriendo que el incremento observado en la expresión del mRNA del MCP-1 inducido por la AngII está mediado por la activación del NF- $\kappa$ B.



**Figura 69.** Efecto de la inhibición de la activación del NF- $\kappa$ B en la expresión del mRNA de MCP-1 inducido por AngII en células mesangiales. Las células fueron preincubadas con PDTC (200 $\mu$ M) durante 1 h, se reemplazó el medio y se estimularon con AngII (10<sup>-7</sup>M) durante 6h. La figura A muestra un Northern blot representativo de 2 realizados, correspondiente a la hibridación con la sonda de MCP-1. (B) La calidad y cantidad de RNA cargado fue comprobada por tinción con bromuro de etidio.

### 2.5. Efecto de la AngIII en la expresión de MCP-1

Recientemente se ha demostrado que la AngIII es un factor quimiotáctico para monocitos (Yamamoto et al., 1993), por lo que determinamos si este producto de degradación de la AngII inducía la expresión de MCP-1 en células mesangiales, comparándolo con la AngII. Como muestra la figura 70, la AngIII indujo la expresión de MCP-1, por un mecanismo dependiente de la activación de la PKC e independiente de la síntesis *de novo* de proteínas, similar al observado para la AngII.

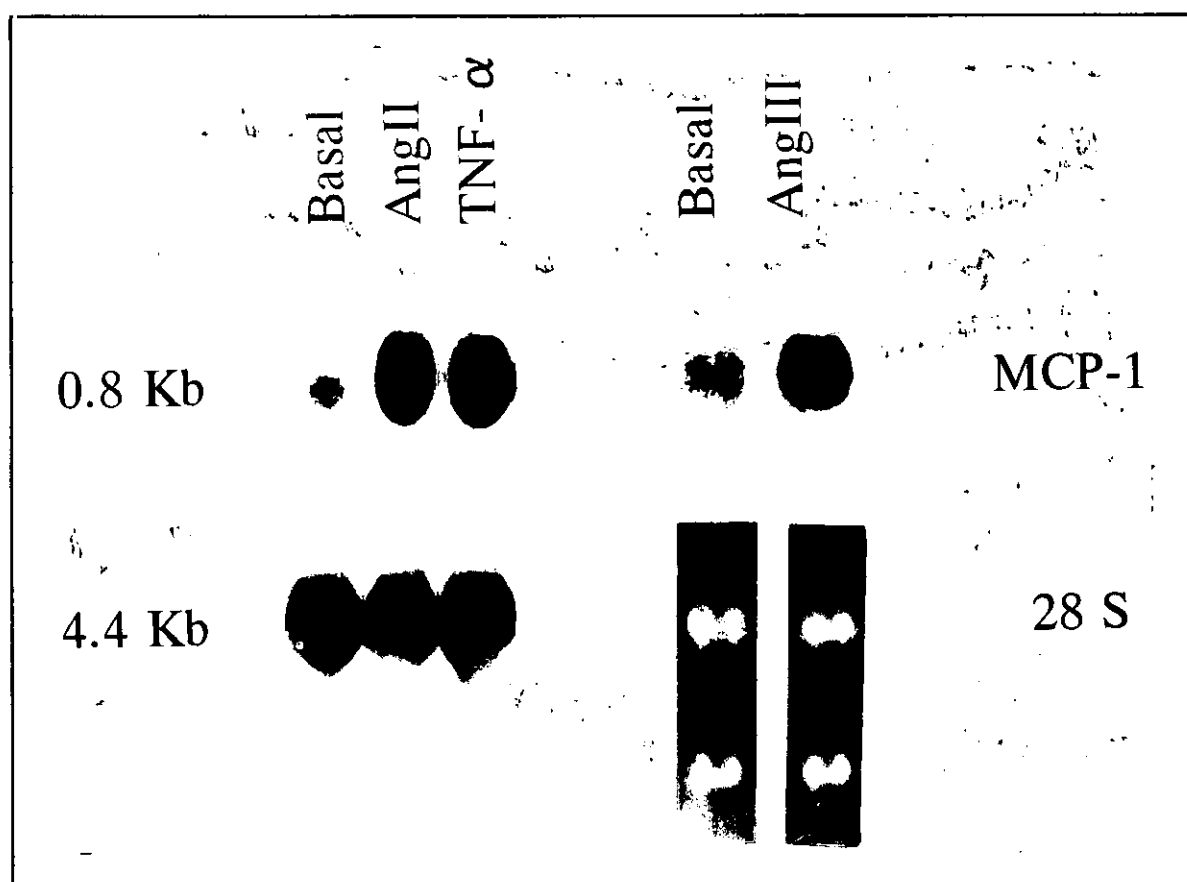


**Figura 70.** Efecto de la AngIII en la expresión de MCP-1 en células mesangiales. Las células fueron preincubadas durante 1h con estaurosporina (10<sup>-5</sup>M) o CHX (1 $\mu$ g/ml) y posteriormente estimuladas durante 6h con AngIII (10<sup>-7</sup>M). La figura muestra un Northern blot representativo de 2 realizados. Línea 1 (basal), línea 2 (AngIII + Estaurosporina), línea 3 (AngIII + CHX), línea 4 (AngIII). Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda.

## 2.6. Expresión de MCP-1 células monocíticas.

La AngII, y su producto de degradación la AngIII, son factores quimiotácticos para células mononucleares humanas (Goetz et al., 1980; Yamamoto et al., 1993). Por lo que el siguiente objetivo fue determinar si estos péptidos inducían la expresión del mRNA del MCP-1 en células circulantes, utilizando para este estudio la línea celular U937 de monocitos humanos.

Las células se incubaron en presencia de AngII y AngIII ( $10^{-7}$ M) durante 6h en un medio libre de suero y agitación constante y la expresión del MCP-1 se cuantificó por Northern blot. Como muestra la figura 71, la AngII y la AngIII inducen un aumento en la expresión de MCP-1 tras 6h de incubación, similar al obtenido con el TNF- $\alpha$  (100 U/ml).



**Figura 71.** Efecto de las angiotensinas en la expresión del mRNA de MCP-1 en células mononucleares. Las células fueron incubadas durante 6 h con  $10^{-7}$ M de AngII y AngIII. La figura muestra un Northern blot representativo de 2 realizados, correspondiente a la hibridación con la sonda de MCP-1. Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda.

### 3. REGULACION DEL RAS POR DIFERENTES ESTIMULOS EN CÉLULAS RENALES.

A pesar del gran número de estudios que han demostrado la participación del RAS en la patogenia del daño renal, existen pocas evidencias de la activación directa de alguno componentes de este sistema por parte de factores implicados en el daño renal. Por lo que nuestro último objetivo ha sido determinar el efecto de sustancias implicadas en el daño renal en la expresión de alguno de los componentes del RAS, con el propósito de apoyar la hipótesis planteada *in vivo* de que la activación de este sistema en situaciones patológicas podría desencadenar y/o amplificar las lesiones renales.

#### 3.1. Regulación de la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub> de la AngII en células mesangiales

En células mesangiales, sólo hay descrito un estudio (en forma de comunicación) donde se demuestra que la IL-1 $\beta$  aumenta la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub> de la AngII, no variando los niveles del mRNA del angiotensinógeno y de la renina (Sajid et al., 1992). La expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub> está regulada por otros factores como esteroides de forbol, dexametasona, aldosterona y agonistas que aumentan el AMPc. Por este motivo, centramos nuestro estudio en la regulación de la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub> de la AngII en células mesangiales, por factores que participan en el desarrollo del daño renal en el modelo inmunológico descrito en esta memoria, como TNF- $\alpha$ , PAF (Ortiz et al., 1995) e inmunocomplejos de IgG (Quirós et al., 1990).

##### 3.1.1. Efecto del TNF- $\alpha$ en la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub>.

En células mesangiales la estimulación con TNF- $\alpha$  (100U/ml) indujo un aumento en la expresión génica del receptor AT<sub>1</sub> a tiempos cortos (3 y 6 h), comparable al producido por la IL-1 $\beta$  (10 U/ml) (figura 72A). Este incremento en el mRNA del receptor se mantuvo al cabo de 24h (figura 72B).

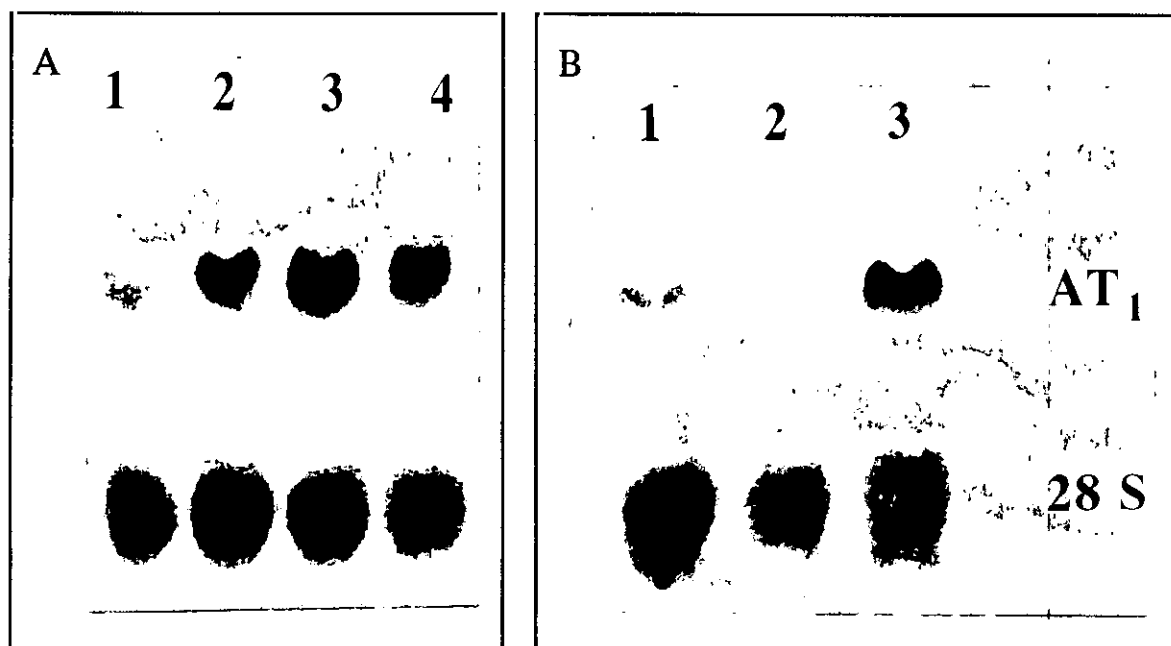
##### 3.1.2. Efecto de los agregados solubles de inmunoglobulinas en la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub>.

En células mesangiales la estimulación durante 6h con agregados solubles de inmunoglobulinas (AIgG) (100 $\mu$ g/ml) provocó un aumento en el mRNA del receptor AT<sub>1</sub> de la AngII, similar al observado en respuesta al TNF- $\alpha$  (figura 73).

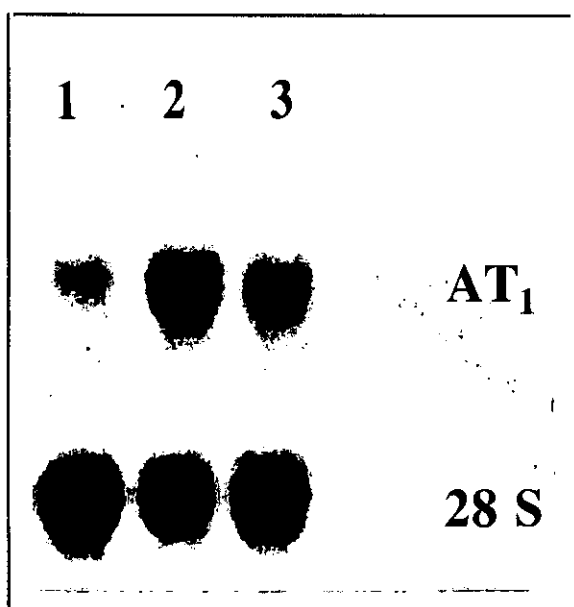
##### 3.1.3. Efecto del PAF en la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub>.

En células mesangiales, la estimulación con PAF (10<sup>-8</sup>M) durante 6 h induce un aumento en la expresión del mRNA de receptor AT<sub>1</sub> (figura 74), que se mantuvo al cabo de 24h.

En conjunto estos resultados muestran que sustancias implicadas en el daño renal regulan la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub>, sugiriendo que en situaciones de daño renal se pueden activar los componentes del RAS tisular.



**Figura 72.** Expresión del mRNA del receptor  $AT_1$  en células mesangiales. (A) Efecto del  $TNF-\alpha$  a tiempos cortos. Las células fueron estimuladas con  $TNF-\alpha$  (100U/ml) durante 3 y 6h. Como control positivo se empleó IL-1 $\beta$  (10U/ml). Línea 1 (Control, 3h), línea 2 ( $TNF-\alpha$ , 3h), línea 3 ( $TNF-\alpha$ , 6h), línea 4 (IL-1 $\beta$ , 6h). (B) Efecto del  $TNF-\alpha$  a tiempos largos. Las células fueron estimuladas con  $TNF-\alpha$  (100U/ml) durante 24h. Como control negativo se empleó AngII ( $10^{-7}$ M). Línea 1 (Control), línea 2 (AngII), línea 3 ( $TNF-\alpha$ ). La hibridación se realizó con la ribosonda del  $AT_1$  marcada radiactivamente. Las figuras muestran un Northern blot representativo de 2 realizados.

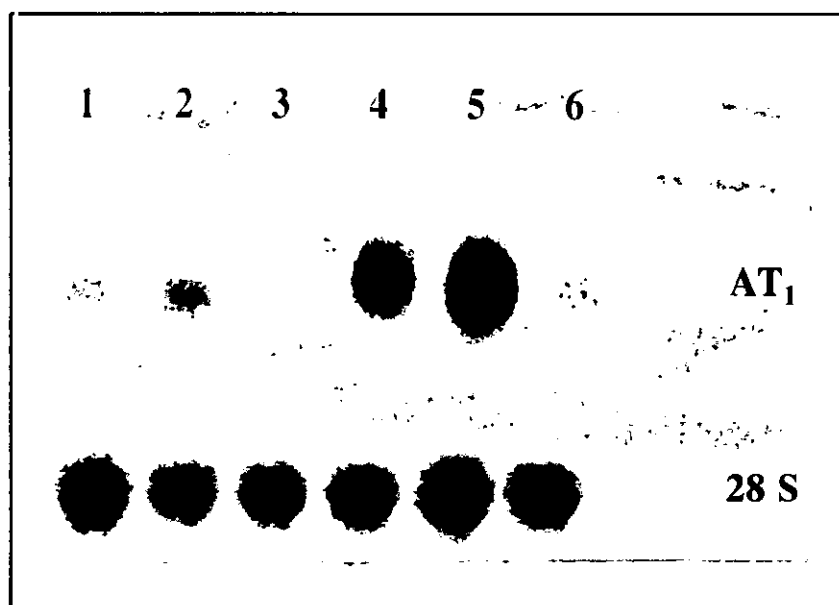


**Figura 73.** Efecto de agregados solubles de IgG en la expresión del mRNA del receptor  $AT_1$  inducida por PAF en células mesangiales. Las células fueron estimuladas con AIGG (100  $\mu$ g/ml) durante 6 h. La hibridación se realizó con la ribosonda del  $AT_1$  marcada radiactivamente. Línea 1 (Control), línea 2 (AIGG), línea 3 ( $TNF-\alpha$ ). La figura muestra un Northern blot representativo de 2 realizados.



### 3.1.3.1. Mecanismos de regulación del mRNA del receptor $AT_1$ por PAF

En segundo lugar hemos abordado el estudio de la regulación de este proceso. La activación de la PKC induce un aumento en la expresión del mRNA del  $AT_1$  (Makita et al., 1992). Como hemos comentado anteriormente, entre las señales intracelulares activadas por el PAF destaca la activación de la PKC por lo que hemos estudiado su participación en la regulación de este gen. La preincubación durante 1h con estaurosporina ( $10^{-7}M$ ) mostró una disminución del 70% en el aumento del mRNA del receptor inducido por el PAF (figura 74), lo que sugiere un mecanismo dependiente de la PKC en el efecto del PAF en la expresión del receptor  $AT_1$ . La inhibición de la síntesis de novo de proteínas, mediante la preincubación durante 1h con cicloheximida (CHX,  $1\mu g/ml$ ), dió lugar a la superinducción de la expresión del mRNA del receptor  $AT_1$  inducido por el PAF (figura 74).



**Figura 74.** Efecto del PAF en la expresión del mRNA del receptor  $AT_1$  en células mesangiales. Mecanismos de regulación. Las células fueron preincubadas durante 1h con estaurosporina ( $10^{-7}M$ ) o con CHX ( $1\mu g/ml$ ), entonces fueron estimuladas durante 6h con PAF ( $10^{-8}M$ ). La hibridación se realizó con la ribosonda del  $AT_1$  marcada radiactivamente. La figura muestra un Northern blot representativo de 2 realizados. Línea 1 (Control), línea 2 (CHX), línea 3 (Estaurosporina), línea 4 (PAF), línea 5 (PAF+CHX), línea 6 (PAF+Estaurosporina).

### 3.2. Regulación de la expresión del mRNA del angiotensinógeno en células renales

En diversas situaciones de daño renal se ha observado un aumento en la expresión de los componentes del sistema renina-angiotensina asociado a una mayor producción de AngII a nivel tisular (ver Apartado 2 de Resultados *in vivo*). La capacidad de síntesis local de AngII ha sido demostrada en diversos tejidos, como corazón, células endoteliales y epiteliales tubulares renales (Gunning et al., 1994). En células mesangiales se ha demostrado la presencia de receptores para la AngII del tipo  $AT_1$ , por otro lado, no se ha podido detectar la presencia de ECA activa (Chansel et al., 1992). En este trabajo hemos demostrado que los fibroblastos intersticiales renales poseen el receptor  $AT_1$ , por lo que el primer objetivo ha sido determinar si ambas células podrían contribuir a la síntesis local de AngII,

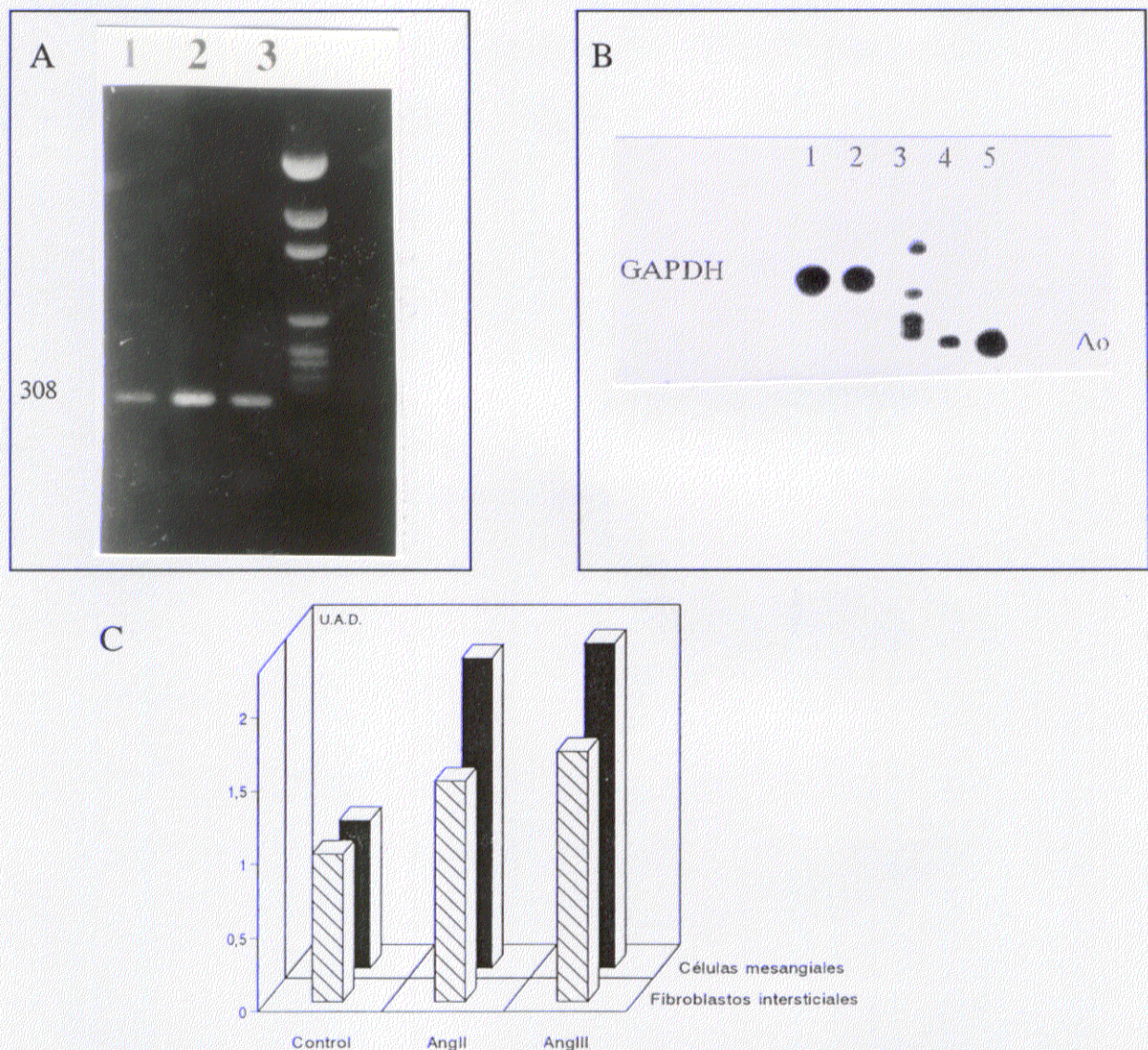


determinando en primer lugar si son capaces de expresar angiotensinógeno (Ao). En segundo lugar, hemos estudiado si la AngII y su producto de degradación, la AngIII, son capaces de regular la expresión del Ao en estas células.

### 3.2.1. Efecto de la AngII en la regulación del mRNA del Ao en fibroblastos intersticiales renales

Mediante RT-PCR hemos demostrado que los fibroblastos intersticiales renales y las células mesangiales expresan mRNA del angiotensinógeno (figura 75), sugiriendo un posible lugar de síntesis intracelular de AngII, como ocurre en diversas células (endoteliales, fibroblastos cardíacos).

La estimulación durante 6 h con angiotensinas y el posterior análisis por RT-PCR demostró un aumento en los niveles del mRNA del angiotensinógeno en ambos tipos celulares (figura 75).



**Figura 75.** Efecto de las angiotensinas en la expresión del mRNA del Ao. Las células fueron incubadas durante 6 h con  $10^{-7}$ M de AngII y AngIII. Autorradiografía representativa del análisis por RT-PCR de fibroblastos intersticiales renales (A) y de células mesangiales (B). Línea 1,4 (basal), línea 2,5 (AngII), línea 3 (marcadores de tamaño). Se indica la posición de los productos de PCR. (C) Análisis densitométrico de los resultados corregidos por el valor de la G3PDH y expresados como n-voces de incremento respecto al control sano, media  $\pm$  DE de 3 experimentos realizados con preparaciones distintas de células.



## **DISCUSSION**

## 1. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ECA EN UN MODELO NORMOTENSO DE NEFRITIS INMUNE

La nefritis experimental estudiada presenta lesiones morfológicas similares a las de la glomerulonefritis mesangiocapilar humana y a la nefritis lúpica (Sánchez-Crespo et al., 1982; Noble et al., 1990). En este modelo de daño renal, las ratas no tratadas desarrollaron un síndrome nefrótico masivo e insuficiencia renal aproximadamente a las tres semanas del comienzo de la proteinuria (Sánchez-Crespo et al., 1982), sin presentar modificaciones en la presión sanguínea. Los animales con nefritis presentan lesiones proliferativas glomerulares, infiltrado inflamatorio y atrofia tubular. La administración de quinapril, un iECA con alta fijación tisular (Johnston et al., 1992; Warworth et al., 1991), a animales con nefritis establecida mejoró la evolución clínica y morfológica de la enfermedad. El efecto beneficioso del quinapril demuestra que el RAS participa en el desarrollo del daño renal en este modelo y confirma que la inhibición de la ECA representa una de una de las mejores alternativas para limitar la evolución de nefropatías humanas a insuficiencia renal terminal. En este sentido, un estudio reciente ha demostrado que el tratamiento con captopril retarda la pérdida de función renal en la nefropatía progresiva asociada a la diabetes tipo I (Lewis et al., 1993).

## 2. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN EL DAÑO RENAL

### 2.1. Estudio de los componentes del RAS en el modelo de nefritis inmune

#### 2.1.1. Actividad de la ECA

Michel y cols., estudiando varios modelos experimentales con efectos opuestos sobre la renina circulante, han demostrado que los niveles de AngII en plasma no son un factor determinante para la actividad de la ECA tisular (Michel et al., 1994). En nuestro modelo, no asociado a hipertensión, hemos demostrado que en las ratas con nefritis la actividad de la ECA en suero no está modificada, mientras que a nivel tisular está significativamente aumentada. Estos resultados demuestran un diferente comportamiento entre el RAS circulante y tisular en este modelo, apoyando la hipótesis de una regulación independiente del RAS local, implicado en aspectos crónicos de la regulación vascular renal, y del RAS circulante, relacionado con la regulación de mecanismos agudos (Dzau et al., 1988).

En el riñón normal, la ECA está localizada fundamentalmente en el borde en cepillo de las células tubulares y en el endotelio de los capilares peritubulares. En situaciones de daño renal, además suele observarse en los capilares glomerulares y en el endotelio de los vasos de la médula (Rosenberg et al., 1994). En las ratas con nefritis hemos observado que el aumento de la actividad de la ECA a nivel tisular procedía de la corteza renal, localizado en el borde en cepillo de las células epiteliales tubulares.

La ECA es una enzima regulada por una gran variedad de factores implicados en el daño renal. En células endoteliales la conversión de AngI a AngII está modulada por la activación de la PKC (Iwai et al., 1987) y por agentes como el PAF y la ET-1 (Kawaguchi et al., 1990a; Kawaguchi

et al., 1990b). En células vasculares de músculo liso la actividad de la ECA aumenta en respuesta al bFGF, pero no a otros factores como PDGF, EGF, AngII y TGF- $\beta$  (Fishel et al., 1995). En este modelo de nefritis hemos descrito previamente un aumento en la producción glomerular de PAF coincidiendo con la aparición de proteinuria (Ortiz et al., 1995). Además, hemos demostrado una correlación entre la intensidad de la proteinuria y el aumento en la actividad de la ECA, lo que sugiere una posible relación causal con el desarrollo del daño renal.

### 2.1.2. Efecto de la inhibición de la ECA

En respuesta al tratamiento con quinapril, la actividad de la ECA sérica fue inhibida completamente, mientras que la ECA renal disminuyó entre 60-80%. Estos resultados son comparables a lo observado, empleando dosis similares de quinapril, en la neointima vascular tras el daño endotelial (Rakugi et al., 1994) y en la distribución tisular de la ECA en ratas sanas (Fabris et al., 1990). La importancia de inhibir la ECA tisular más que la sérica ha sido enfatizada recientemente (Dzau, 1988; Mulrow, 1993).

### 2.1.3. Expresión génica de los componentes del RAS en las ratas con nefritis

A pesar de la evidencia experimental y clínica de la eficacia de los iECAs en enfermedades renales, existe poca información sobre la regulación de la expresión de los genes que codifican los componentes del RAS. La redistribución y la activación del RAS intrarenal ocurre en algunos modelos de daño renal. En los modelos de masa renal reducida y de obstrucción ureteral unilateral se ha demostrado un aumento de la renina (Anderson et al., 1993; Pimentel et al., 1993; Pimentel et al., 1995). Por el contrario, en la nefropatía diabética los datos de la expresión de la renina son contradictorios.

La participación del RAS tisular en el desarrollo del daño renal viene apoyada por estudios de transfección génica. La inyección *in vivo* del gen del Ao y de la renina en el riñón, localizados en las células mesangiales, origina un aumento en la expresión de colágenos intersticiales y en la expansión de la matriz mesangial (Arai et al., 1995).

#### 2.1.3.1. Expresión de la ECA

La expresión del gen de la ECA está regulada de manera diferente en cada tejido. En células endoteliales se induce por hipoxia, endotelina, iECAs y otros estímulos (King et al., 1992). En las ratas con nefritis hemos observado un ligero aumento en la expresión del mRNA de la ECA en la corteza renal, sugiriendo que el aumento en la actividad de este enzima está regulado a nivel génico.

La administración de quinapril a animales sanos o con nefritis indujo, en ambas situaciones, un incremento en la expresión de la ECA en la corteza renal. Estos resultados están de acuerdo con lo publicado en respuesta a la inhibición crónica de la ECA (Schunkert et al., 1993).

### 2.1.3.2. Expresión del Angiotensinógeno

Los niveles del gen del Ao en las ratas con nefritis están aumentados en la corteza y en la médula renal. Se ha demostrado que el mRNA del Ao se encuentra elevado durante diversas situaciones de daño tisular (Kageyama et al., 1985; Hoj et al., 1987). Además, hemos demostrado que la AngII aumenta la expresión génica del Ao en células mesangiales y en fibroblastos intersticiales renales. Por tanto, diversos factores, entre los que cabe destacar concentraciones elevadas de AngII, podrían contribuir a aumentar su expresión *in vivo*.

### 2.1.3.3. Expresión del receptor AT<sub>1</sub>

En las ratas con nefritis hemos observado un aumento en la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub> en la corteza renal y una disminución en la médula. En estudios *in vitro* se ha demostrado que la AngII disminuye la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub> en células mesangiales (Makita et al., 1992), pero lo aumenta en células epiteliales tubulares (Cheng et al., 1995). Por tanto, la regulación de la expresión génica del receptor AT<sub>1</sub> en las ratas con nefritis no puede atribuirse al aumento en la concentración de AngII local, sino que deben existir otros factores implicados en este proceso.

En respuesta al quinapril la expresión del receptor AT<sub>1</sub> se modificó existiendo una tendencia hacia los valores de ratas sanas sin tratamiento.

En las ratas sanas tratadas con quinapril existió un aumento en la expresión del mRNA del AT<sub>1</sub> en la corteza renal y una disminución en la médula. Resultados similares han sido observados en conejos tratados con captopril, con aumento en la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub> en hígado, corteza renal, glomérulos, y disminución en el túbulo proximal y en la glándula suprarrenal (Cheng et al., 1995). Esta regulación de la expresión del receptor se acompañó de alteraciones en la densidad de receptores y de la disminución en la unión de <sup>125</sup>I-AngII a las células del túbulo proximal. Además, en ratas tratadas con captopril existió una disminución en los sitios de unión de AngII a membranas de la corteza renal (Lewis et al., 1989).

Estos resultados demuestran que los niveles locales de AngII originan cambios en la expresión del receptor AT<sub>1</sub>, variando la respuesta en función de la estructura renal.

En conjunto los resultados obtenidos demuestran que las ratas con nefritis presentan un aumento en la actividad de la ECA en tejido renal, lo que sugiere una producción local aumentada de AngII. Esta mayor concentración tisular de AngII puede ser uno de los factores implicados en el desarrollo del daño renal en este modelo. Además, la expresión génica de algunos componentes del RAS está modificada en las ratas con nefritis (figura 76). El mRNA del Ao está aumentado en la corteza y médula renal, y existe una redistribución del mRNA del receptor AT<sub>1</sub>. Todo esto demuestra una activación del RAS tisular, aunque estudios futuros serán necesarios para localizar los tipos celulares implicados en estos procesos. Además, las ratas con nefritis tratada con quinapril presentan una inhibición del 60-80% en la actividad de ECA renal, sugiriendo que la inhibición de la generación local de la AngII puede ser una de las causas del efecto beneficioso de esta clase de fármacos.

NEFRITIS		NEFRITIS QUINAPRIL		CONTROL QUINAPRIL		
CORTEZA	MEDULA	CORTEZA	MEDULA	CORTEZA	MEDULA	
↑↑	↑	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	Actividad ECA
↑	≈	↑	≈	↑↑	↑↑	mRNA ECA
↑	↑	≈	≈	≈	≈	mRNA Ao
↓↓	↑↑	↓	≈	↓↓	↑↑	mRNA AT <sub>1</sub>

**Figura 76.** Componentes del sistema renina-angiotensina en el modelo de nefritis inmune. Efecto del tratamiento con quinapril.

\* Nota: ↑ aumenta  
↓ disminuye  
≈ no varía

## 2.2. Regulación de los componentes del RAS por factores implicados en el daño renal en el modelo de nefritis inmune. Estudios *in vitro*

La mayor parte de los efectos inducidos por la AngII en células renales, como la contracción mesangial, proliferación y síntesis de proteínas de matriz, son originados por la unión al receptor AT<sub>1</sub>. Como se ha comentado en la Introducción, la regulación del receptor de la AngII tiene lugar a varios niveles, siendo el control de su expresión el que está relacionado con la función celular.

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado la participación de citoquinas, como el TNF- $\alpha$ , y lípidos, como el PAF, en la patogenia de esta nefritis. Además existió una correlación entre el aumento en la síntesis glomerular de TNF- $\alpha$  y la progresión de la enfermedad (Ortiz et al., 1995). En estudios *in vitro* hemos observado que el TNF- $\alpha$ , el PAF y los inmunocomplejos de IgG regulan la expresión génica de los componentes del RAS. En concreto, aumentan la expresión del mRNA del receptor AT<sub>1</sub> en células mesangiales en cultivo. Estos resultados demuestran una activación directa de los componentes del RAS por sustancias implicadas en el daño renal, sugiriendo una posible explicación al incremento observado en la expresión génica del receptor AT<sub>1</sub> en la corteza renal en las ratas con nefritis.

Los componentes del RAS pueden controlar la expresión del mRNA del Ao y su secreción. La infusión de AngII en ratas incrementa los niveles circulantes de Ao y su expresión en riñón y en hígado (Khayyall et al., 1973). Por el contrario, la renina inhibe la liberación de Ao, como se ha demostrado en ratas nefrectomizadas o tratadas con anticuerpos anti-renina (Hermann et al., 1983). En estudios *in vitro* hemos observado que la AngII y su producto de degradación la AngIII, aumentan la expresión del Ao en células mesangiales y en fibroblastos intersticiales, sugiriendo una regulación autocrina de la síntesis de AngII. Este resultado podría explicar, al menos en parte, el aumento observado en el mRNA del Ao en la corteza renal de las ratas con nefritis.



### 3. MECANISMO DEL EFECTO BENEFICIOSO DE LOS INHIBIDORES DE LA ECA

Múltiples estudios en nefropatías experimentales y humanas han demostrado que el tratamiento con iECAs mejora la evolución de la enfermedad. Sin embargo, los mecanismos de su efecto beneficioso no son bien conocidos. A continuación se discute si alguno de los mecanismos sugeridos (página 19, tabla 4) podrían estar implicados en el modelo de nefritis inmune estudiado en este trabajo.

#### 3.1. Efecto hemodinámico

Un resultado importante de nuestro trabajo es la observación de que el efecto beneficioso del tratamiento con iECA ocurre en ausencia de hipertensión. La mayor parte de los estudios han sido realizados en modelos como la masa renal reducida y la nefropatía diabética, asociados a hipertensión, donde el efecto beneficioso se atribuye a causas hemodinámicas. El modelo de daño renal utilizado en este trabajo se indujo en ratas normotensas. Además, la existencia de una tensión arterial no modificada durante el curso de la enfermedad, ni en respuesta al tratamiento, demuestra que el efecto beneficioso del quinapril en este modelo es independiente de su efecto sobre de la tensión arterial.

#### 3.2. Efecto sobre el atrapamiento de macromoléculas

Esta nefritis se caracteriza por presentar depósitos de inmunocomplejos de IgG en todas las áreas glomerulares (Sánchez-Crespo et al., 1982). Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que los inmunocomplejos, a través de la unión a los receptores Fc presentes en las células mesangiales (Gómez-Guerrero et al., 1993), estimulan la proliferación celular y la síntesis de proteínas de matriz extracelular, procesos mediados por citoquinas, como el TNF- $\alpha$ , la IL-6 y el TGF- $\beta$  (Gómez-Guerrero et al., 1994; López-Armada et al., 1994). Estos datos sugieren que el daño renal en este modelo inmune podría estar relacionado con el acúmulo de estas macromoléculas en el mesangio. La AngII afecta al tráfico mesangial de macromoléculas, produciendo un atrapamiento que podría conducir a la esclerosis glomerular (Keane et al., 1985). Teóricamente, por tanto, el efecto beneficioso de la administración de un iECA en este modelo podría atribuirse a una disminución en el atrapamiento de macromoléculas. Sin embargo, no hemos observado que el quinapril modificara la intensidad y localización de los depósitos inmunes glomerulares, sugiriendo que este mecanismo no está operando en este modelo.

#### 3.3. Efecto sobre el sistema de quininas

Los efectos beneficiosos de los iECAs pueden ser atribuidos al aumento de las bradiquininas, con la consiguiente generación de óxido nítrico y prostaglandinas. En células de músculo liso vascular y en células mesangiales el óxido nítrico inhibe la proliferación y regula la síntesis de proteínas matriz extracelular (Kolpakov et al., 1995; Trachtman et al., 1995). Futuros estudios empleando antagonistas de los receptores de la AngII, de las bradiquininas o de la generación del óxido nítrico son necesarios para confirmar esta hipótesis.

### 3.4. Efecto de la AngII en la progresión del daño renal.

Una de las hipótesis defendidas en este trabajo es que el efecto beneficioso de los iECAs, en la prevención de la progresión del daño renal, puede ser atribuido a su capacidad de modular los efectos de la AngII sobre las células renales, modificando su proliferación, la síntesis de matriz y de citoquinas proinflamatorias y profibrogénicas.

#### 3.3.1. Papel de la AngII en la glomeruloesclerosis

Como ocurre en otras enfermedades renales progresivas (Klahr et al., 1988; Marx et al., 1993), en este modelo de nefritis existió proliferación mesangial y acúmulo de matriz extracelular en el área glomerular. En la corteza renal se observó un marcado aumento en la expresión del mRNA de los componentes normales de la matriz extracelular glomerular (fibronectina y colágeno tipo IV) y, en menor medida, de los colágenos intersticiales (tipos I y III). Además, las ratas con nefritis presentaron un mayor depósito de fibronectina y colágeno tipo IV a nivel glomerular. En respuesta al tratamiento con quinapril se observó una disminución de la expansión mesangial y de la esclerosis glomerular, acompañada por una inhibición en la expresión génica de las proteínas de matriz. Estos resultados sugieren que el efecto beneficioso de la inhibición de la ECA en la síntesis de proteínas de matriz extracelular ocurre a nivel del control de la transcripción de estos genes. Resultados similares han sido demostrados recientemente en respuesta al tratamiento con enalapril en el modelo de obstrucción ureteral, donde se observa una disminución de la fibrosis intersticial y de la síntesis y expresión de colágeno tipo IV (Kaneto et al., 1994). En ambos modelos, la expresión génica de las proteínas de matriz en la corteza renal no es completamente abolida por la administración del iECA, por lo que no se pueden descartar otros mecanismos distintos del efecto directo de la AngII.

Los mecanismos de señales intracelulares originados por agentes vasoactivos, como la AngII, y por factores de crecimiento relacionados con la proliferación, como el PDGF, son bastante similares, ya que ambas sustancias activan la fosfolipasa C y aumentan la expresión de protooncogenes como c-fos y erg-1 (Ross et al., 1986; Ichikawa et al., 1991). Recientemente, se ha demostrado que en células mesangiales fetales la AngII tiene un efecto mitogénico, dependiente del receptor AT<sub>1</sub>, mayor que en células adultas (Ray et al., 1994). Además, la AngII presenta un efecto sinérgico en presencia de PDGF-BB (Marinides et al., 1992). En este trabajo hemos demostrado que en células mesangiales de rata la AngII estimula la proliferación, de manera dosis dependiente, no presentando efecto sinérgico en presencia de citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  y la IL-6, implicadas en la progresión de algunas glomerulonefritis. Aunque la proliferación inducida por la AngII es modesta comparada con otros factores de crecimiento, como el PDGF, puede tener un papel muy importante en la expansión mesangial observada en las glomerulonefritis asociadas a un aumento en la concentración local de AngII, donde podría actuar como estímulo constante durante tiempos prolongados.

El aumento en la síntesis de proteínas de matriz extracelular a nivel mesangial podría deberse al incremento en la concentración local de AngII. En células mesangiales hemos demostrado que la AngII estimula la expresión y síntesis de varios componentes de la matriz extracelular. Además, la infusión *in vivo* de AngII induce la proliferación celular y síntesis de proteínas de matriz (Jonhson et

al., 1992). Este resultado confirma la hipótesis defendida por varios autores de que la AngII es un factor de crecimiento renal (Ichikawa et al., 1991; Wolf et al., 1993a; Egido, 1996) al ser capaz de inducir proliferación y síntesis de matriz extracelular en células mesangiales y epiteliales tubulares.

### 3.3.2. Papel de la AngII en la fibrosis intersticial renal

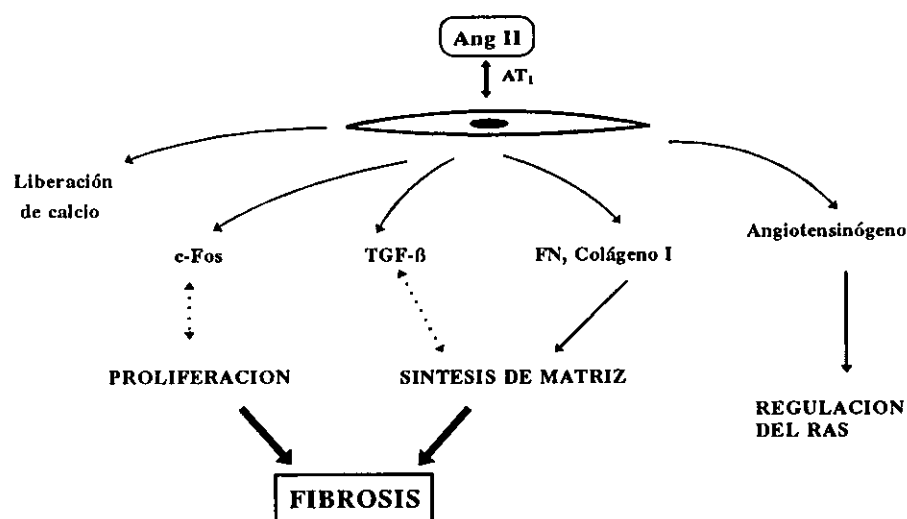
Un hecho llamativo de nuestro estudio es la importante disminución de las lesiones tubulointersticiales en las ratas con nefritis tratadas con quinapril. La mayoría de los estudios recientes sobre la progresión de las diversas formas de glomerulonefritis han mostrado que el grado de daño tubulointersticial, más que la extensión de la afectación glomerular determina el pronóstico final de la evolución de la enfermedad. Estas alteraciones pueden conducir a la fibrosis intersticial renal a través de una vía común caracterizada por atrofia tubular, proliferación de las células intersticiales, principalmente fibroblastos, y aumento de la síntesis de matriz extracelular (Bohle et al., 1994a y b).

Una de las hipótesis del efecto beneficioso de los iECAs en esta zona podría atribuirse al bloqueo de la acción de la AngII sobre las células tubulares y los fibroblastos intersticiales. Otra posible explicación es que el daño tubulointersticial podría ser una consecuencia de la persistencia de la proteinuria y, por consiguiente, este efecto beneficioso sería una consecuencia indirecta de la disminución en la excreción urinaria de proteínas.

El fibroblasto es la principal célula efectora de la fibrosis intersticial. Se ha demostrado que los fibroblastos procedentes de riñones humanos con fibrosis intersticial presentan mayor proliferación y síntesis de colágenos tipo I y III y fibronectina que los fibroblastos de riñones sanos (Rodemann et al., 1991). Kuncio y cols. defienden que el origen de la fibrosis intersticial se puede atribuir a la liberación de citoquinas por parte de las células tubulointersticiales y/o células infiltrantes, que contribuyen a la proliferación de fibroblastos y al depósito de matriz extracelular (Kuncio et al., 1991). Una de las hipótesis defendidas en este trabajo es que la AngII, generada localmente, podría actuar de modo directo sobre los fibroblastos intersticiales, activándolos y, por tanto, contribuyendo al desarrollo de la fibrosis renal.

Datos recientes sugieren que el RAS podría jugar un papel importante en la fibrosis intersticial en el riñón. Estudios realizados en modelos de daño tubulointersticial, como la nefrosis por puromicina y la obstrucción ureteral unilateral han demostrado un efecto beneficioso del tratamiento con iECAs y con antagonistas del receptor AT<sub>1</sub> (Diamond et al., 1990; Kaneto et al., 1994; Ishidoya et al., 1995). La infusión de AngII induce la expresión de genes tempranos y aumento en el mRNA del PDGF-B localizado en el área intersticial (Rosenberg et al., 1990), provocando al cabo de 14 días fibrosis intersticial, caracterizada por depósito de colágeno tipo IV, proliferación de células intersticiales y cambios en el fenotipo de los fibroblastos, que expresan  $\alpha$ -actina, una proteína asociada a las células de músculo vascular (Johnson et al., 1992). La expresión en células intersticiales de antígenos de células vasculares se ha descrito en el modelo de obstrucción ureteral (Nagel et al., 1978). También, se ha observado que los fibroblastos expresan  $\alpha$ -actina en procesos de reparación tisular (Skalli et al., 1990).

En células epiteliales tubulares en cultivo la AngII induce hipertrofia y síntesis de colágeno tipo IV (Wolf et al., 1991). Mediante estudios *in vitro* hemos demostrado, por primera vez, que la AngII estimula directamente los fibroblastos intersticiales renales, favoreciendo su proliferación y la síntesis de proteínas de matriz extracelular, como la fibronectina, y de factores de crecimiento, como el TGF- $\beta$  (figura 77). Hemos observado que fibroblastos renales de distinto origen (conejo, rata y murino) presentan receptores para la AngII de tipo AT<sub>1</sub>. Los estudios realizados en la línea celular NRK49F muestran que este receptor está ligado a señales intracelulares, como la liberación de calcio y la inducción de protooncogenes, como el c-fos, similares a las observadas en fibroblastos cardíacos (Crabos et al., 1994). Los fibroblastos renales también podrían contribuir a la producción local de AngII al expresar el mRNA del angiotensinógeno. Además, este gen aumenta en respuesta a la estimulación con AngII. Estos resultados están de acuerdo con estudios de fibroblastos cardíacos que muestran que son capaces de sintetizar AngII (Dostal et al., 1992). Los fibroblastos, por tanto, responden a la AngII, pudiendo generar más AngII que podría actuar de forma autocrina o paracrina.



**Figura 77.** Efectos de la interacción entre AngII y fibroblastos intersticiales.

La AngII interacciona con fibroblastos neonatales cardíacos *in vitro* mediante la unión al receptor AT<sub>1</sub> (Villarreal et al., 1993), aumentando la síntesis de DNA y de proteínas totales (Schorb et al., 1993) e induciendo la expresión de genes de respuesta tempranos como c-fos, c-jun y c-myc, y de factores de crecimiento, como el TGF- $\beta$  (Crabos et al. 1994). Además, varios estudios han demostrado que los fibroblastos cardíacos tienen un papel activo en la fibrosis cardíaca (citadas). La infusión de AngII induce un aumento en la síntesis de fibronectina asociado con fibroblastos intersticiales proliferativos (Cradwford et al., 1994). Estos resultados muestran similitudes entre los procesos de fibrosis cardíaca y renal, donde la interacción AngII y fibroblastos intersticiales juega un papel activo en estos procesos de daño tisular.

Los estudios *in vitro* de la interacción de AngII y fibroblastos intersticiales podría explicar la fibrosis intersticial observada en el modelo de obstrucción ureteral y el hecho de que durante el daño producido por la infusión de AngII los fibroblastos intersticiales se activen, proliferen y secreten colágeno tipo IV. Estos resultados sugieren que el aumento local de AngII podría ser una de las causas de la progresión del daño intersticial observado en la mayoría de las enfermedades renales progresivas.

### 3.3.3. Efecto de la AngII en la síntesis y expresión de citoquinas y factores de crecimiento

Recientemente se ha sugerido que el efecto beneficioso de los iECAs sobre la esclerosis glomerular e intersticial observada en modelos de daño renal podrían reflejar la modulación de la síntesis de factores de crecimiento y matriz extracelular inducida por la AngII (revisado en Brunner, 1992; Egido, 1996).

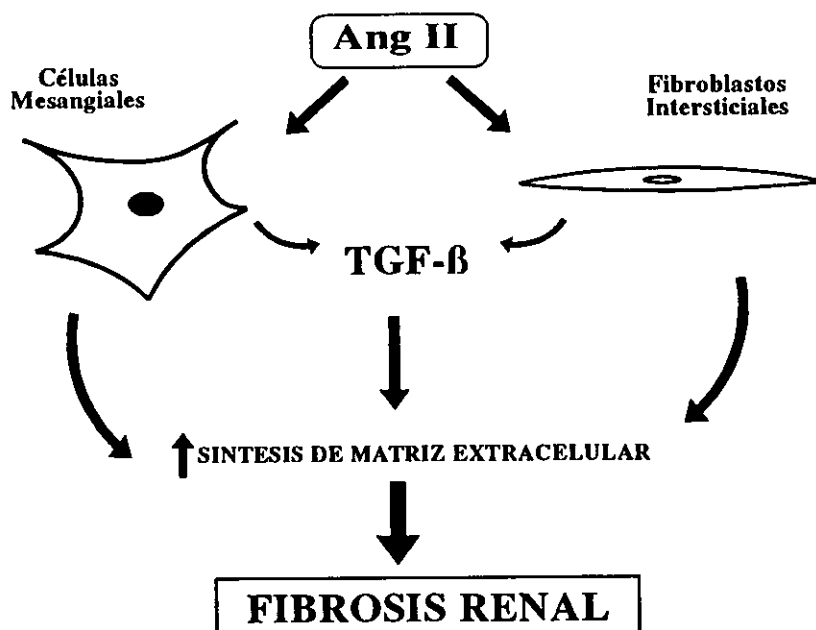
Una de las hipótesis planteadas en este trabajo es que parte de los efectos de la AngII pueden ser debidos a la síntesis de diversas sustancias, como factores de crecimiento (TGF- $\beta$ ), péptidos vasoactivos (ET-1) y factores lipídicos (PAF), que pueden actuar como mediadores en situaciones caracterizadas por un aumento de la generación local de AngII.

#### *3.3.3.1. Papel del TGF- $\beta$*

Estudios recientes han centrado el interés en la relación entre el RAS y el TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$  es una citoquina con múltiples funciones, entre las que destaca su efecto en la producción de proteínas de matriz extracelular (revisado en Border et al., 1992), cuya expresión génica está aumentada en varios modelos experimentales (Okuda et al., 1990; Kaneto et al., 1993). La infusión *in vivo* de AngII induce la expresión glomerular del TGF- $\beta$  (Kagami et al., 1994). Además, la AngII aumenta la expresión y síntesis del TGF- $\beta$  en varios tipos celulares (Wolf et al., 1993a; Itoh et al. 1993; Kagami et al., 1994).

En nuestro modelo experimental, el máximo daño renal coincidió con el aumento del mRNA del TGF- $\beta$ 1 en la corteza renal. El tratamiento con quinapril normalizó la expresión génica del TGF- $\beta$ 1. Resultados similares de inhibición en la expresión del mRNA del TGF- $\beta$ 1 han sido demostrados en el modelo de obstrucción unilateral en respuesta al tratamiento con enalapril (Kaneto et al., 1994).

En estudios *in vitro* hemos demostrado que el TGF- $\beta$  está implicado en los procesos de regulación de la matriz extracelular inducidos por la AngII (figura 78). En este sentido, en células mesangiales y en fibroblastos intersticiales hemos demostrado que la AngII induce la expresión del mRNA del TGF- $\beta$ 1. Además, en células mesangiales hemos observado que la presencia en el medio de anticuerpos anti-TGF $\beta$  bloquea la síntesis de fibronectina inducida por la AngII. Estos datos indican que el efecto terapéutico de los iECAs en la síntesis de proteínas de matriz en estos modelos de nefritis puede ser debido a la reducción de la expresión génica del TGF- $\beta$ .



**Figura 78.** *Papel del TGF- $\beta$  en la fibrosis renal inducida por AngII.* Esquema del efecto de la AngII en células mesangiales y fibroblastos intersticiales. En ambos tipos celulares aumenta la proliferación, la síntesis de matriz y la expresión de factores de crecimiento.

### 3.3.3.2. *Papel de la endotelina*

La endotelina ha sido implicada en la patogenia del daño renal en varios modelos experimentales (revisado en Remuzzi et al., 1993). En este trabajo hemos observado un aumento en la expresión renal de la preproET-1 que se correlacionó con el máximo daño renal y el aumento en la actividad de la ECA. Mediante hibridación *in situ* se localizó a nivel de las células mesangiales y epiteliales glomerulares, y en algunos túbulos. En respuesta al quinapril existió una disminución de la expresión renal de la preproET-1 hasta valores de las ratas sanas. Además, en este modelo el empleo de un antagonista dual de los receptores ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> de la endotelina mejora la evolución de la enfermedad (Gómez-Garre et al., 1995).

Diversos autores han sugerido la existencia de una interrelación entre la AngII y la ET-1 en la regulación de la función renal (Webb et al., 1992; Chan et al., 1994). En células mesangiales en cultivo, la AngII y la ET-1 inducen respuestas similares, como contracción, proliferación celular y síntesis de proteínas de matriz (revisado en Egido, 1996). En estas células la AngII induce la síntesis de ET-1 (Kohno et al., 1992). Además, la ET-1 es responsable de algunos fenómenos inducidos por la AngII como la contracción en aorta de rata (Webb et al., 1992) y el efecto mitogénico en células mesangiales (Bakris et al., 1993). Mediante el empleo de BQ123, un antagonista del receptor ET<sub>A</sub>, hemos observado que parte del efecto de la AngII sobre la síntesis de fibronectina es debido a la producción endógena de ET-1. Por lo tanto, el efecto beneficioso de los iECA podría ser también debido a la inhibición de la síntesis renal de ET-1.

No obstante, no podemos descartar la existencia de un mecanismo más complejo, ya que existe una interrelación entre la ET-1 y el RAS. El tratamiento con quinapril atenúa los efectos hemodinámicos inducidos por la infusión de intrarrenal de ET-1 en perros (Chan et al., 1994). Los iECAs inhiben algunos fenómenos inducidos por la ET-1, como la síntesis de proteínas, la expresión de genes de respuesta tempranos (Neyses et al., 1992), y la proliferación (Bakris et al., 1994) y la síntesis de FN en células mesangiales (Gómez-Garre et al., 1995). Además de la disminución de la generación de AngII, los iECAs podrían actuar a través de las bradiquininas y del óxido nítrico. En este sentido, el captopril inhibe la síntesis de endotelina vía bradiquininas (Momose et al., 1993). Por otro lado, la AngII potencia la vasoconstricción inducida por ET-1 (Dohi et al., 1992). La infusión sistémica de ET-1 incrementa la síntesis renal de renina (Chan et al., 1994) e inhibe la síntesis glomerular de renina de modo similar a la AngII (Rakugi et al., 1988). En células endoteliales de arteria pulmonar la ET-1 es capaz de regular la actividad de la ECA (Kawaguchi et al., 1990a). Todos estos datos sugieren que parte del efecto beneficioso de los iECA podría atribuirse a la modulación de los efectos de la ET-1 en la hemodinámica renal, la proliferación celular y la síntesis de matriz.

#### *3.3.3.4. Papel del factor activador de las plaquetas (PAF)*

Recientemente se ha observado que las alteraciones en la selectividad capilar glomerular inducidas por la AngII están mediadas por la síntesis local de PAF (Konopka et al., 1995). En células mesangiales el efecto del PAF sobre la síntesis y expresión de proteínas de matriz es mayor que el de la AngII y comparable al de citoquinas como la IL-6, sugiriendo que es un potente inductor de la matriz extracelular. Además, el PAF incrementa la expresión y síntesis de TGF- $\beta$  de manera similar a la descrito en respuesta a la AngII (Kagami et al., 1994). Mediante el empleo de antagonistas de los receptores del PAF, hemos demostrado el efecto de este lípido sobre la síntesis de FN inducida por la AngII. Este fenómeno puede ser ampliable a otros metabolitos del ácido araquidónico. En particular, se ha sugerido que las prostaglandinas participan en el crecimiento celular y la producción de matriz inducida por la AngII (Ardaillou et al., 1990).

#### 3.3.4. Mecanismos de regulación de la matriz mesangial en respuesta a la estimulación con AngII

En este trabajo hemos observado que la AngII induce la síntesis de matriz mesangial por un mecanismo dependiente de la síntesis endógena de TGF- $\beta$ , común a otras sustancias como el PAF, los inmunocomplejos (López-Armada et al., 1994) y el tromboxano A<sub>2</sub> (Studer et al., 1995), entre otras (figura 79). En presencia de anticuerpos neutralizantes del TGF- $\beta$  se inhibe el efecto de la AngII y del PAF sobre la síntesis de FN.

Entre las respuestas celulares inducidas por la AngII y el PAF en las células mesangiales destaca la activación de la PKC. En estas células, la PKC juega un papel importante en la regulación de la expresión y síntesis de TGF- $\beta$ . Hemos demostrado que la AngII y el PAF inducen la expresión de TGF- $\beta$  por un mecanismo dependiente de PKC, ya que la preincubación con estaurosporina, un inhibidor de proteínas quinasas, mostró una disminución en el aumento del mRNA del TGF- $\beta$ 1 provocado por ambas sustancias. Además, la síntesis de FN inducida por la AngII está regulada por la activación de la PKC, de modo similar a lo descrito para el TxA<sub>2</sub> (Studer et al., 1995). Todos estos



resultados confirman la hipótesis de que una serie de sustancias como la AngII, el PAF, las LDL y el TxA<sub>2</sub> (figura 79) actúan a través de una vía común caracterizada por la activación de la PKC y la síntesis endógena de TGF- $\beta$ .

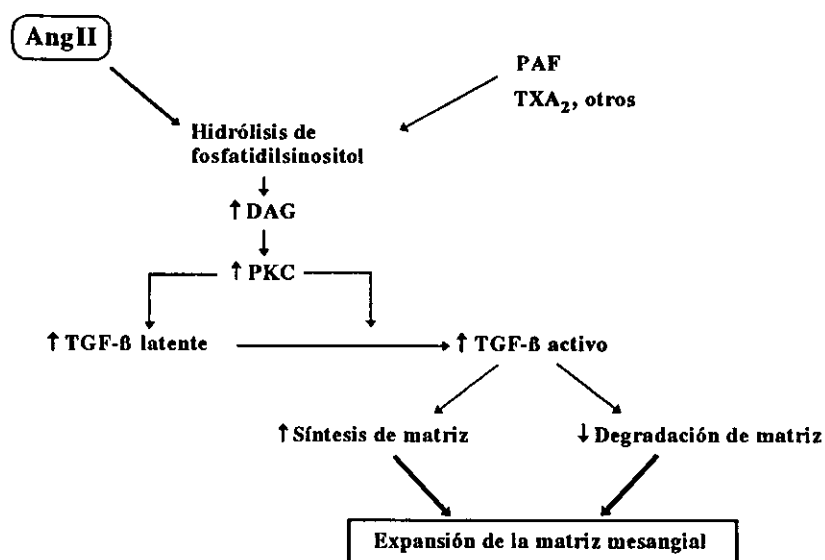


Figura 79. Mecanismos de regulación de la matriz extracelular

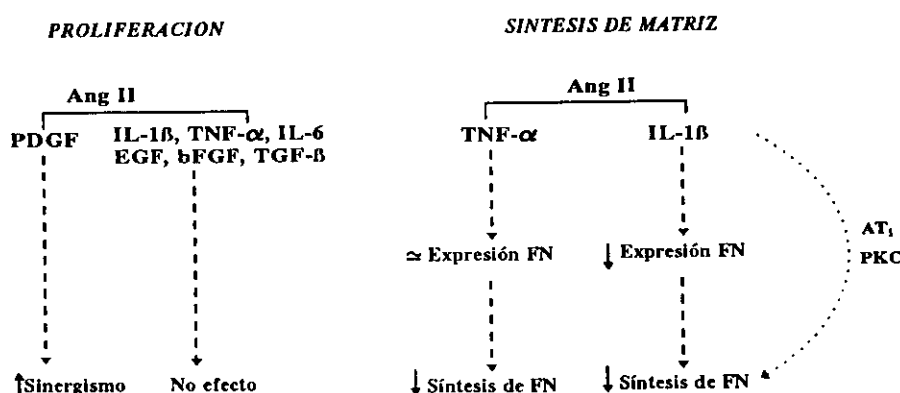
### 3.3.5. Interacción AngII y citoquinas en células mesangiales

Una de las hipótesis planteadas en este trabajo ha sido que la presencia simultánea en el entorno glomerular de AngII y factores de crecimiento pudiera dar lugar a la amplificación del daño renal.

Como hemos comentado anteriormente, la coincubación de AngII y PDGF-BB, produce un efecto sinérgico en la proliferación mesangial (Marinides et al., 1992), que no se observó cuando la AngII se coincubó con citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . La AngII induce la expresión del gen de respuesta temprana c-fos, que se asocia a un aumento en la proliferación celular (Tsuda et al., 1986). La coincubación de AngII e IL-1 $\beta$  no tuvo un efecto sinérgico en la expresión génica del c-fos inducida de manera aislada. Estos resultados sugieren que la presencia simultánea de AngII y citoquinas proinflamatorias no amplifica la respuesta proliferativa de las células mesangiales (figura 80).

Sorprendentemente la coincubación de cada una de estas citoquinas y AngII indujo una inhibición de la síntesis de fibronectina en relación a la producción originada por las citoquinas de manera aislada. Además, el efecto en la expresión génica de esta proteína fué diferente dependiendo de la citoquina estudiada. En presencia de AngII se inhibió la expresión del mRNA de FN inducido por la IL-1 $\beta$  hasta valores basales, sugiriendo que este efecto inhibitorio se produce a nivel de la regulación de la expresión génica. Por el contrario, la coincubación con AngII no afecta a la expresión de FN inducida por el TNF- $\alpha$ , indicando que el efecto inhibitorio observado en la síntesis de FN tiene lugar a nivel postranscripcional.

La inhibición en la expresión de la FN en presencia de AngII e IL-1 $\beta$  está mediada por la síntesis de una proteína regulada ya que en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis *de novo* de proteínas, desaparece este efecto. También hemos observado que la AngII inhibe la síntesis de FN inducida por la IL-1 $\beta$ , de manera dosis y tiempo dependiente, a través de la unión al receptor AT<sub>1</sub>, por un mecanismo que implica la activación de la PKC (figura 80). Por otro lado, la síntesis de FN inducida por la IL-1 $\beta$  sigue un mecanismo independiente de la activación de la PKC, diferente al descrito para la AngII y el PAF.

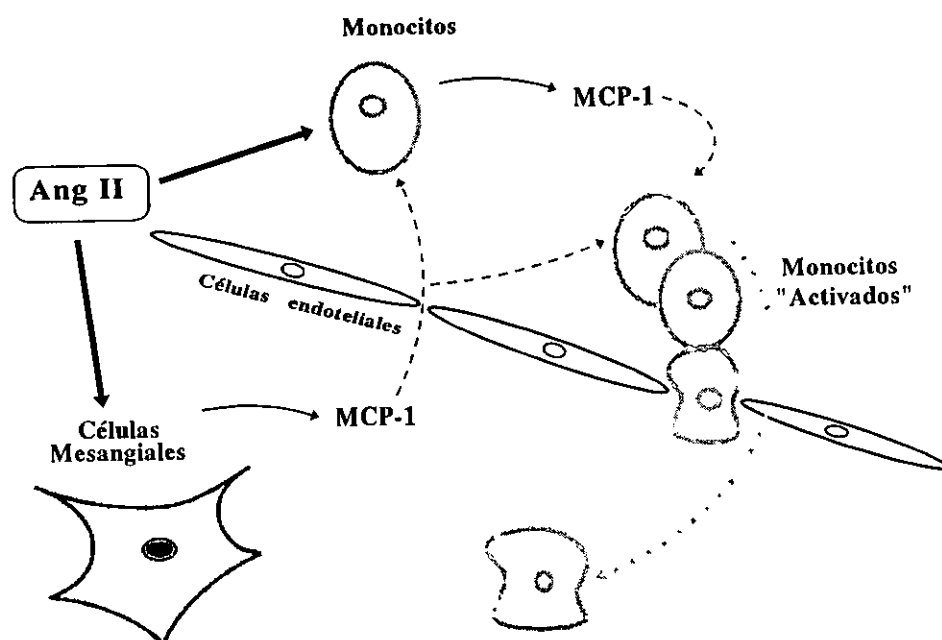


**Figura 80.** Efecto de la coincubación de citoquinas y AngII en la proliferación y síntesis de matriz en células mesangiales

### 3.3.6. Papel de la AngII en el reclutamiento celular.

El daño renal progresivo está asociado con infiltración en el área glomerular e intersticial por células inflamatorias (Klahr et al., 1988). En las ratas con nefritis inmune no tratada hemos observado la presencia en ambas zonas de un gran número de células inflamatorias, fundamentalmente macrófagos, que disminuye en respuesta a la inhibición de la ECA. Resultados similares han sido observados en el modelo de nefritis intersticial por ligadura unilateral (Kaneto et al., 1994). Como los macrófagos son el principal componente del infiltrado de las enfermedades renales y el MCP-1 induce la migración de monocitos *in vivo* e *in vitro* (Zachariae et al., 1990), la producción *in situ* de este factor quimioattractante puede jugar un papel importante en la regulación del reclutamiento de monocitos en la patología renal. Además, estas células podrían activar la proliferación y migración de los fibroblastos intersticiales (Kuncio et al., 1991). En las ratas con nefritis hemos demostrado un aumento en la expresión del mRNA del MCP-1 en la corteza renal, que coincidió con el máximo infiltrado y que disminuye en respuesta al tratamiento con quinapril. Estos resultados sugieren que parte del efecto beneficioso del iECA podría deberse a la disminución del número de células infiltrantes en el riñón, proceso mediado por la inhibición de la expresión renal del MCP-1.

Previamente se ha demostrado que la AngII, y su producto de degradación, la AngIII, tienen efectos quimioattractantes sobre células mononucleares (Ichikawa et al 1991). En estudios *in vitro* hemos demostrado que la AngII, al actuar sobre monocitos induce la expresión del MCP-1. Este factor que podría ser una de las sustancias responsables del efecto quimiotáctico de la AngII descrito en estas células (Ichikawa et al., 1991). Es posible que el incremento en la generación local de AngII observada en la corteza renal de ratas con nefritis pudiera ser responsable de la expresión aumentada del MCP-1 en el riñón de esos animales. Estos datos están de acuerdo con el acúmulo de células mononucleares que ocurre en el glomérulo y en el intersticio de ratas sanas con infusión sistémica de AngII durante 7-14 días (Johnson et al 1992). Además, en este trabajo, hemos demostrado que la AngII, al actuar sobre células mesangiales, induce la expresión y síntesis de sustancias quimiotácticas, como el MCP-1, sugiriendo un posible mecanismo que explicaría de reclutamiento celular en el área glomerular (figura 81).

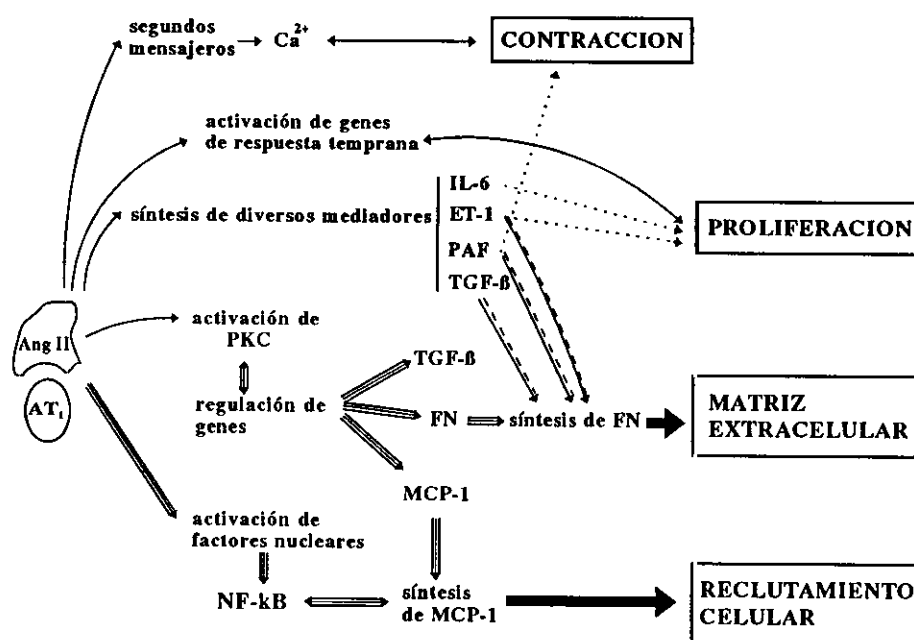


**Figura 81.** Hipótesis del papel de la AngII en el reclutamiento celular a nivel renal. La liberación de sustancias quimiotácticas, como el MCP-1, por parte de las células estimuladas por la AngII, podría dar lugar a la migración de monocitos desde la luz capilar hasta el mesangio.

En el modelo de obstrucción ureteral unilateral, la administración de enalapril, pero no de un antagonista del receptor  $AT_1$ , disminuyó el infiltrado de células mononucleares en el parénquima renal (Ishidoya et al., 1995). Aunque los mecanismos de este efecto divergente de ambos fármacos no es conocido, es posible que la disminución en la producción de óxido nítrico participe en este proceso. En este sentido, en células endoteliales se ha observado que una disminución en la producción basal de óxido nítrico provoca un aumento en la síntesis de MCP-1 (Zeiher et al., 1995). Además, el bloqueo de los receptores  $AT_1$  incrementaría la concentración de la AngII y de sus productos de degradación como la AngIII. Este último péptido podría participar en el reclutamiento celular puesto que, se ha demostrado que es un factor quimiotáctico para células mononucleares (Yamamoto et al 1993) y es capaz de inducir la expresión de MCP-1 en monocitos y en células mesangiales.

### 3.3.7. Efecto de la AngII en células mesangiales

En este trabajo hemos aportado nuevos datos del efecto de la AngII en células mesangiales (figura 82). La AngII, al interaccionar con las células mesangiales a través de la unión al receptor  $AT_1$ , origina una serie de respuestas a corto plazo, como la liberación de segundos mensajeros, la activación de proteínas quinasas, la inducción de genes de respuesta tempranos y, como hemos demostrado en este trabajo, la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Estas respuestas se traducen en diferentes efectos a largo plazo, como proliferación celular, síntesis de matriz extracelular y reclutamiento celular.



**Figura 82.** Mecanismos intracelulares en respuesta a la AngII en células mesangiales. En la figura se resumen algunas de las respuestas celulares producidas tras la estimulación con AngII relacionadas con procesos asociados al daño renal.

Nota:

Efectos de la AngII

← Datos demostrados en este trabajo

← Datos demostrados por otros autores

Factores mediadores en los efectos de la AngII

← Datos demostrados en este trabajo

← Datos demostrados por otros autores

Como muestra la figura 82, en células mesangiales:

- la AngII es un agente mitogénico débil. La proliferación celular inducida por la AngII está regulada por citoquinas como la IL-6 y ET-1 (Moriyama et al., 1995; Bakris et al., 1993). En presencia de anticuerpos antiTGF- $\beta$  la respuesta hipertrófica se convierte en hiperplásica (Kagami et al., 1994), lo que sugiere que dependiendo de las condiciones de cultivo varía el crecimiento de las células mesangiales.

- la AngII activa la PKC (Mené et al., 1989). Hemos demostrado que la activación de esta proteína quinasa participa en la regulación de diversos fenómenos inducidos por la AngII, como la expresión de factores de crecimiento (TGF- $\beta$ ), la síntesis de proteínas de matriz extracelular (FN), y la expresión de factores quimiotácticos (MCP-1).

- la AngII aumenta la síntesis de proteínas de matriz extracelular. En este trabajo hemos observado que la síntesis de FN inducida por la AngII está regulada por diversas sustancias, como el TGF- $\beta$ , la ET-1 y el PAF.

- la AngII puede participar en el reclutamiento celular a nivel renal mediante la síntesis de MCP-1, que ocurre a través de la activación del factor nuclear NF-kB.

La activación de factores de transcripción es un paso crítico en la traducción de señales al núcleo. El NF-kB es una familia de proteínas que se unen a una secuencia común de la molécula de DNA y actúan como potenciadores de la transcripción. La activación del NF-kB es independiente de la síntesis de nuevas proteínas (Sen et al., 1986) y consiste en la disociación del NF-kB de la subunidad citoplasmática inhibidora (I $\kappa$ B) seguido de la traslocación del heterodímero p50-p65 hacia el núcleo, donde se une a una secuencia de DNA y activa la transcripción (Grimm et al., 1993). Los mecanismos de activación del NF-kB no están completamente elucidados, parece que múltiples serina-treonina-proteasas están implicadas (Suzuki, 1994). Aunque diversos activadores de la PKC inducen la activación del NF-kB, no existen evidencias directas que demuestren que las quinasas juegan un papel en este fenómeno. El NF-kB se modula por diversos agentes, como los activadores de la PKC o citoquinas como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Chaturvedi et al., 1994). Recientemente, en células mesangiales murinas se ha demostrado que la AngII induce la síntesis de IL-6, gen cuyo promotor tiene un sitio de unión al NF-KB. Se ha sugerido que en células vasculares de músculo liso, la AngII activa factores nucleares que se unen a la secuencia AP-1, promotor que se encuentra en muchos genes, como el TGF- $\beta$  (Takeuchi et al., 1990). Recientemente se ha demostrado que en estas células, la AngII estimula factores de transcripción de la familia STAT (Marrero et al., 1995).

## **CONCLUSIONES**

## I. ESTUDIOS *IN VIVO*

1. La administración de quinapril, un inhibidor de la ECA con alta fijación tisular, a ratas con nefritis por inmunocomplejos, previene el desarrollo de síndrome nefrótico y mejora las lesiones morfológicas, disminuyendo el infiltrado inflamatorio y la esclerosis renal.

2. El sistema renina angiotensina renal se encuentra activado en las ratas normotensas con nefritis inmune. A nivel de la expresión del mRNA se observa un aumento del angiotensinógeno y de la ECA, así como una redistribución del receptor  $AT_1$ . La actividad de la ECA, enzima clave en la generación de AngII, está significativamente elevada, sobretodo en las células epiteliales tubulares.

En respuesta al tratamiento con quinapril, las ratas con nefritis presentan una inhibición de la actividad de la ECA tisular alrededor del 70% y se modifica la expresión de algunos genes del sistema renina angiotensina.

3. En ratas con nefritis la administración de quinapril disminuye la expresión y/o síntesis de factores de crecimiento (TGF- $\beta$ 1 y ET-1), citoquinas quimioattractantes (MCP-1) y proteínas de matriz extracelular (fibronectina y colágenos tipo I,III y IV).

## II. ESTUDIOS *IN VITRO*

1. En células mesangiales y fibroblastos intersticiales, la AngII induce proliferación, expresión de TGF- $\beta$  y síntesis de proteínas de matriz extracelular.

La síntesis de matriz mesangial en respuesta a AngII es un fenómeno complejo, que implica activación de la PKC y la síntesis de mediadores, como el TGF- $\beta$ , la ET-1 y el PAF.

La presencia simultánea en el medio de cultivo de AngII y citoquinas como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , extrapolando lo que ocurre durante el daño renal, no tuvo efecto sinérgico en la proliferación mesangial e inhibió la síntesis de fibronectina.

2. En células mesangiales la AngII aumenta la síntesis y expresión del factor quimiotáctico MCP-1, mediante un mecanismo dependiente de la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B.

3. La expresión génica del receptor  $AT_1$  está regulada por sustancias implicadas en el daño renal. El TNF- $\alpha$ , el PAF y los inmunocomplejos de IgG aumentan la expresión del mRNA del receptor  $AT_1$  en células mesangiales. La AngII y su producto de degradación, la AngIII, incrementan el gen del angiotensinógeno en células mesangiales y fibroblastos intersticiales renales.



En este trabajo hemos demostrado que el sistema renina angiotensina está implicado en el origen y en la progresión del daño renal en un modelo de nefritis inmune no asociado a hipertensión. La existencia de un aumento en la actividad de la ECA a nivel renal sugiere que la AngII generada localmente podría ser uno de los factores implicados en el desarrollo del daño renal en este modelo.

En conjunto, hemos aportado nuevos datos sugiriendo que la AngII es un factor importante en la patogenia de la esclerosis renal. La AngII, a través de la activación del factor NF-kB y del incremento en la síntesis de MCP-1, participaría en el reclutamiento de células mononucleares a nivel renal. La AngII, actuando directamente sobre las células mesangiales y los fibroblastos intersticiales, es capaz de modular la proliferación y la síntesis de proteínas de matriz. Nuestros resultados proporcionan nueva información sobre la importancia de modular el sistema renina angiotensina en la progresión de la enfermedad renal.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Adler S, Striker LJ, Striker GE, Perkinson DT, Hibbert BA, Couser WG. Studies of progressive glomerular sclerosis in the rat. *Am J Pathol* 123:553-560, 1986.
- Alexopoulos E, Seron D, Hartley RB, Nolasco F, Cameron JS: The role of interstitial infiltrates in IgA nephropathy: A study with monoclonal antibodies. *Nephrol Dial Transplant* 4:187-195, 1989.
- Alvarez RJ, Sun MJ, Haverty TP, Iozzo RV, Myers JC, Neilson EG. Biosynthetic and proliferative characteristics of tubulointerstitial fibroblast probed with paracrine cytokines. *Kidney Int* 41:14-23, 1992.
- Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM: Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest* 76:612-619, 1985.
- Anderson S, Ingelfinger JR, Hirsch AT, Bouyounes B, Brenner BM. Renin-angiotensin system during evolution of nephrotic syndrome (abstract) *Clin Res* 38:358A, 1990.
- Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR. Renal angiotensin system in diabetes: Functional, immunohistochemical, and molecular biological correlations. *Am J Physiol* 256:F477-F486, 1993.
- Arai M, Wada A, Isaka Y, Kaneda Y, Ochi S, Imai E, Takama T, Fujiwara Y, Ukeda N, Ando A, Kamada T. Mesangial matrix expansion induced by in vivo transfection of renin and angiotensin converting enzyme genes to rat kidney *J Am Soc Nephrol*, 1994.
- Ardalliou N, Nivez MP, Belon G, Canbe C, Ardalliou R. Effect of prostaglandin E<sub>2</sub> on proline uptake and protein synthesis by cultured human mesangial cells *Kidney Int.* 38: 1151-1158, 1990.
- Assoian RK, Frolik CA, Roberts AB, Miller DM, Sporn MB. *Cell* 36, 35-41, 1984.
- Bagby SP, Kirk EA, Mitchell KL, O'Reilly, Holden WE, Stenberg PE, Bakke AC: Proliferative synergy of ANG II and EGF in porcine aortic vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265:F239-F249, 1993.
- Bakris GL, Bhandaru S, Akerstrom V, Re RN. Endothelin modulates angiotensin II-induced mitogenesis of human mesangial cells. *Am J Physiol* 264:F937-F942, 1993
- Bakris GL, Bhandaru S, Akerstrom V, Re RN. ACE inhibitor-mediated attenuation of mesangial cell growth. A role for endothelin. *Am J Hypertens* 7:583-590, 1994
- Baud L, Oudinet JP, Bens M, Noe L, Peraldi MN, Rondeau E, Etienne J, Ardaillou R. Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide. *Kidney Int* 35:1111-1118, 1989.
- Bazan H, Tao Y, Bazan NG. Platelet-activating factor induces collagenase expression in corneal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 90:8678-8682, 1993.
- Bernstein KE, Berk BC. The biology of angiotensin II receptors. *Am J Kidney Dis.* 22:745-754, 1993.
- Braquet P, Esanu A, Buisine E, Kosford D, Broquet C, Koltai M: Recent progress in Ginkgolide research. *Med Res Rev.* 11:295-235, 1991
- Brasier AR, Li J, Copland A. Transcription factors modulating angiotensinogen gene expression in hepatocytes. *Kidney Int.* 46:1564-1566, 1994.
- Bohle A, Strutz F, Müller GA. On the pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant Suppl* 2: 205-210, 1994 a.
- Bohle A, Werhmann M, Mackensen-Haen S, Gise h, Mickeler E, Xiao TC, Müller C, Müller GA. Pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies. *Nephro Dial Transplant Suppl* 3:4-12, 1994 b.

- Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, and Rouslahi E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor- $\beta$ 1. *Nature (Lond)* 346:371-374, 1990.
- Border WA, Rouslahi E: Transforming growth factor- $\beta$  in disease: The dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 90:1-7, 1992.
- Brunner HR, Gvaras H, Laragh JH, Keenan R. Angiotensin II blockade in man by saralasin for understanding and treatment of blood pressure. *Lancet*. 1045-1048, 1973.
- Brunner HR: ACE inhibitors in renal disease. *Kidney Int* 42:463-479, 1992.
- Burns KD, Homma T, Harris RC. The intrarenal renin angiotensin system. *Seminars in Nephrology*. 13:13-30, 1993
- Bustos C, Gonzalez S, Ruiz-Ortega M, Gómez-Guerreo C, Gonzalez E, Plaza JJ, Egido J. Cyclosporin A modulates the glomerular production of inflammatory mediators and proteoglycans in experimental nephrosis. *Clin Exp Immunol*, 102:608-613, 1995.
- Camussi G. Potential role of platelet-activating factor in renal patophysiology. *Kidney Int* 29:469-477, 1986.
- Caldwell PRB, Seegal BC, Hsu KC, et al. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science*. 191:1050, 1976.
- Casals-Stenzel J, Muacevic G, Weber KH: Pharmacological actions of WEB2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. *J Pharmacol Exp Ther*. 241:974-981, 1987
- Chan DP, Clavell A, Keiser J, JC Burnett. Effects of renin-angiotensin system in medianting endothelin-induced renal vasoconstriction: therapeutic implications *J Hipertens*. 12 (suppl 4):S43-S49, 1994.
- Chang ZL, Beezhold DH, Personius CD, Shen ZL. Fibronectin cell-binding domain triggered transmembrane signal transduction in human monocytes. *J Leukocyte Biol* 53:79-85, 1993.
- Chansel D, Czekalski S, Pham P, Ardaillou R. Characterization of angiotensin II receptor subtypes in human glomeruli and mesangial cells. *Am J Physiol*. 262:F432-F441, 1992.
- Chansel D, Czekalski S, Vandermeersch S, Ardalliou R. Rat mesangial cells posses AngII (3-8) receptors ( $AT_4$ ) distint from  $AT_1$  . *J Am Soc Nephrol* 1995
- Chaturvedi MM, Higuchi M, Aggarwal BB. Effect of tumor necrosis factors, interferons, interleukins, and growth factors on the activation of NF- $\kappa$ B: Evidence for lack correlation with cell proliferation. *Lymphokine and cytoquine research* 13:309-313, 1994.
- Chao W, Olson MS. Plateled-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem. J*. 292:617-629, 1993.
- Cheng HF, Becker BN, Burns KD, Harris RC. Angiotensin II upregulates type-1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule *J Clin Invest* 95: 2012-2019, 1995.
- Chomczynski P, Sacchi N: Single-step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-cloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
- Clark RA, Wikner NE, Doherty DE, Norris DA. Cryptic chemotactic activity of fibronectin for human monocytes resides in the 120 kda fibroblastic cell binding domain. *J Biol Chem* 263:12115-12123, 1988.
- Courtney PJ, Kanwar YS, Hynes RO, Farquar MG. Fibronectin localization in the rat glomerulus. *J Cell Biol* 87:691-698, 1982.
- Crabos M, Roth M, Hahn AW, Erne P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. Coupling to signaling systems and gene expression. *J Clin Invest* 93:2372-2378, 1994.

- Crawford D, Chobanian AV, Brecher P. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res* 74:727-739, 1994.
- Cushman DW, Cheung HS, Sabo HF, Sabo HF, Ondetti MA. Development and design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Am J Cardiol*. 49:1390-1394, 1982.
- Danierpour D, Dart LL, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MD. Immunodetection and quantification of the two forms of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2) secreted by cells in culture. *J Cell Physiol*. 138:79-86, 1989.
- Danilov SM, Faerman AJ, Printseva OY, et al. Immunohistochemical study of angiotensin-converting enzyme in human tissues using monoclonal antibodies. *Histochemistry* 87:487, 1987
- Diamond JR, Anderson S. Irreversible tubulointerstitial damage associated with chronic aminonucleoside nephrosis, amelioration by angiotensin I converting enzyme inhibition. *Am J Pathol* 137:1323-1331, 1990
- Dohi Y, Hanh AWA, Boulanger CM, Buhler FR, Lüscher TF: Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension* 19:131-137, 1992.
- Dostal DE, Rothblum KN, Conrad KM, Cooper GR, Baker KM. Detection of angiotensin I and II in cultured cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol* 263:C851-C863, 1992.
- Dzau VJ. Circulating versus local renin angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77 (Suppl 19):1-4, 1988.
- Dzau VJ, Pratt RE. Tissue renin angiotensin system in experimental restenosis after vascular injury. Evidence of local activation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 20:S28-S32, 1992.
- Dzau VJ, Mukoyama M, Pratt RE. Molecular biology of angiotensin receptors : target for drug research ? *J Hypertens* 12 (Suppl 2) S1.S5, 1994.
- Eddy AA, Crary GS, Michael AF: Identification of lymphohemopoietic cells in the kidneys of normal rats. *Am J Pathol* 124:335-342, 1986.
- Egido J. Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Nephrology Forum. Kidney Int*. 49: 578-597, 1996.
- Ehlers MRW, Riordan JF. Angiotensin converting enzyme. New concepts concerning its biological role. *Biochemistry* 28:5311-5318, 1989.
- El Nahas AM. Renal scarring: the role of angiotensin II. *Nephrol Dial Transp (Suppl9)* 10:28-32, 1995.
- Emancipator SN, Sedor JR. Cytokines in renal disease. In: Remick DG, Kunkel SL. *Cytokines in Diseases*. Boston; Marcel Dekker, 467-488, 1992.
- Fabris B, Chen B, Pupic V, Perich R, Johnston, Inhibition of angiotensin converting enzyme in plasma and tissue. *J Cardiovasc Pharmacol* 15 (suppl 2)S6-S13, 1990.
- Farak AH, Lindop GBM, Morley AR et al. Three dimensional reconstruction of human juxtaglomerular apparatus. *APMIS* 100:29-38, 1992.
- Ferreri NR, Zhao Y, Takizawa H, Nasjletti A, McGiff JC. Angiotensin II induces tumor necrosis factor in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1995.
- Ffrench-Constant C, van de Water L, Dvorak HF, Hynes RO: Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol* 109:903-914, 1989.
- Floege J, Johnson RJ, Gordon K, Iida H, Pritzliff P, Yoshimura A, Campbell C, Alpers CE, Couser WG. Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis *Kidney Int* 40:447-488, 1991

- Fishel RS, Thourani V, Eisenberg SJ, Shai SY, Corson MA, Nabel EG, Bernstein KE, Berk BC. Fibroblast growth factor stimulates angiotensin converting enzyme expression in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 95:377-387, 1995
- Fontoura BMA, Nussenzveig DR, Timmermans PBMWM, Maack T. Dup753 is a potent nonpeptide antagonist of angiotensin II receptors in isolated perfused rat kidney and in cultured renal cells. *Am J Hypertens.* 4:S303-S308, 1991.
- Friedland J, Setton C, Silverstein E. Induction of angiotensin converting enzyme in human monocytes in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 83:843, 1978.
- Fujiwara Y, Tamaka T, Shin S, Ochi S, Fukunaga M, Orita Y, Kamada T. Angiotensin II stimulates mesangial cell growth through phosphoinositide cascade (abstract). *Proc Am Soc Nephrol* 24A, 1988.
- Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ: Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs hyperplasia. *J Clin Invest.* 90:456-461, 1992.
- Goetzl EJ, Klicksten LB, Watt KWK, Sintroub BU. The preferential human mononuclear leukocyte chemotactic activity of the substituent tetrapeptides of angiotensin. *Biochem Biophys Res Commun* 97:1097-1102, 1980.
- Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension, production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 59: 347-379, 1935.
- González-Cuadrado S, López-Armada Sobirá D, Garcia-Sahuquillo A, Ortiz-Gonzalez A, Nielson EG, Egido J, Ortiz A. Anti-fas antibodies induces cytolysis and apoptosis in cultured human mesangial cells. *Kidney Int.* 44: 1064-1070, 1996
- Gómez-Chiarri M, Ortiz A, Serón D, Lerma JL, González E, Egido J. The intercrine superfamily and renal disease. *Kidney Int* 43:S81-S85, Suppl 39, 1993.
- Gómez-Garre D, Ruiz-Ortega M, Ortego M, Largo R, González E, Egido J. ACE inhibition decrease the endothelin-induced proliferation and fibronectin synthesis in cultured mesangial cells. (abstract) *Endothelium.* Vol 2 (suppl)S6, 1995.
- Gómez-Garre D, Liu XH, Largo R, Gutierrez S, Alonso J, Palacios I, Lopez-Armada MJ, Barat A, Egido J. An orally active ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor antagonist improves proteinuria and glomerular lesions in a normotensive rat model of immune complex nephritis (abstract). *J Am Soc Nephrol* 6:866, 1995.
- Gómez-Guerrero C, González E, Egido J. Evidence for specific IgA receptor in rat and human mesangial cells. *J. Immunol.* 151:7172-7177, 1993.
- Gómez-Guerrero C, Lopez-Armada MJ, González E, Egido J. Soluble IgG and IgA aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF- $\alpha$  and IL-6, and proliferation. *J. Immunol.* 153:5247, 1994.
- Gómez-Guerrero C, Duque N, Egido J. The stimulation of Fc $\alpha$  receptors induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ 1, phosphatidylinositolphosphate hydrolysis, and Ca<sup>2+</sup> mobilization in rat and human mesangial cells. *J Immunol*, 1996 (en prensa)
- González-Cuadrado S, López-Armada MJ, Gómez-Guerrero C, Subirá D, Garcia-Sahuquillo A, Ortiz-Gonzalez A, Neilson EG, Egido J, Ortiz A. Anti-fas antibodies induce cytolysis and apoptosis in cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 1064-1070, 1996
- Griendling KK, Alexander RW. The angiotensin (AT<sub>1</sub>) receptor. *Seminars in Nephrol.* 13:558-566, 1993.
- Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin angiotensin system. *Circulation.* 87: 1816-1828, 1993.

- Grimm S, Baeuerle PA. The inducible transcription factor NF-kappa B: Structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J.* 290:297, 1993.
- Gunning ME, Ingelfinger JR, King AJ, Brenner BM. Vasoactive peptides and the kidney. *The kidney* 627-649, 1994
- Hanh AWA, Regenass S, Kern F, Bühler FR, Resink TJ: Expression of soluble and insoluble fibronectin in rat aorta: effects of angiotensin II and endothelin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 192:189-197, 1993.
- Hansch GM, Wagner C, Burger A, Dong W, Staehler G, Stoeck M. Matrix protein synthesis by glomerular mesangial cells in culture: effects of transforming growth factor- $\beta$  and PDGF on fibronectin and collagen type IV mRNA. *J Cell Physiol.* 163:451-457, 1995.
- Harolson MA, Jacobson HR, Hoover RL. Collagen polymorphism in cultured rat kidney mesangial cells. *Lab Invest* 57:513, 1987.
- Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Hist Cytochem.* 31:1333-1335, 1983.
- Hermann HC, Dzau VJ. The feedback regulation of angiotensinogen production by components of the renin angiotensin system. *Circulation* 52:328, 1983.
- Hoj Nielsen A, Knudsen F. Angiotensinogen is an acute-phase protein in man. *Scand J Clin Lab Invest.* 47:175, 1987.
- Homma T, Hoover RL, Ichikawa I, Harris RC. Angiotensin II induces hypertrophy and stimulates collagen production in cultured rat glomerular mesangial cell (abstract) *Clin Res* 38:358, 1990.
- Hostetter TH, Olson JL, Renke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 241:F85-F93, 1981.
- Horikoshi S, Ray PE, Adler SH, Kopp JB, Koide H, Klotman PE: Interleukin-6 stimulates fibronectin expression by human mesangial cells (abstract) *J.Am.Soc. Nephrol.* 2:576, 1991.
- Hynes RO. *Fibronectins*. New York. Springer Verlag, 1990.
- Ichikawa I, Harris RC. Angiotensin actions in the kidney: renewed insight into the old hormone. *Kidney Int* 40:583-596, 1991.
- Ignatz RA, Massagué J. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their deposition into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261:4337-4345, 1986.
- Ikemoto F, Song G, Tominaga M. Angiotensin converting enzyme predominates in the inner cortex and medulla of the rat kidney. *Biochem Biophys Res Comm* 144:915-921, 1987.
- Ingelfinger JR, Zuo WM, Fon E, Ellison CE, Dzau VJ. In situ hybridization evidence for angiotensinogen mRNA in the rat proximal tubule. *J Clin Invest* 85:417-423, 1990.
- Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T Imai E. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor- $\beta$  or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 92:2597-2601, 1993.
- Ishimura E, Sterzel RB, Budde K, Kashagarian M. Formation of extracellular matrix by cultured rat mesangial cells. *Am J Pathol* 134(4):843-55, 1989.
- Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 47: 1285-1294, 1995



- Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ: Multiple growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest*, 91:2268-2274, 1993.
- Iwai N, Matsunaga M, Kita T, Tei M, Kawai C. Regulation of ACE activity in cultured human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 149:1179-1185, 1987.
- Jacobson HR. Chronic renal failure: pathophysiology. *Lancet*. 338: 491-423, 1991.
- Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM: Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension*. 19:464-474, 1992.
- Johnston CI, Jandeleit K, Mooser V et al., Angiotensin converting enzyme and its inhibition in the heart and blood vessels . *J Cardiovasc Pharma*. 20 (suppl B): S6-S11, 1992
- Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- $\beta$  expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93:2431-2437, 1994.
- Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S. Induction of rat liver angiotensinogen mRNA following acute inflammation *Biochem Biophys Res Commun* 129:826, 1985.
- Kaname S, Uchida S, Ogata E, Kurokawa K. Autocrine secretion of transforming growth factor- $\beta$  in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 42:1319-1327, 1992.
- Kaneto H, Morrissey J, Kharl S: Increased expression of TGF- $\beta$  mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation. *Kidney Int*. 44:313-321, 1993.
- Kaneto H, Norrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. Enalapril reduces collagen type IV synthesis and expansion of the interstitium in the obstructed rat kidney. *Kidney Int* 45:1637-1647, 1994.
- Kashgarian M, Sterzel RB. The pathobiology of the mesangium. *Kidney Int* 41:524-529, 1992.
- Kawaguchi H, Sawa H, Yasuda H: Endothelin stimulates angiotensin I to angiotensin II conversion in cultured pulmonary endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 22:839-842, 1990 a.
- Kawaguchi H, Sawa H, Iizuka K, Yasuda H: Platelet-activating factor stimulates angiotensin converting enzyme activity. *J Hypertens*. 8:173-177, 1990 b.
- Keane WF, Raij L. Relationship among altered glomerular barrier permselectivity, angiotensin II and mesangial uptake of macromolecules. *Lab Invest* 52: 599-604, 1985
- Kester M, Thomas CP, Wang J, Dunn MJ. Platelet activating factor stimulates multiple signalling pathways in cultured rat mesangial cells. *J. Cell Physiol*. 153(2):244-255, 1992.
- Kester M, Mandal A, Musial AM. Ether-linked diclycerides inhibit receptor mediated protein kinase C activity in rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 4:489, 1993
- King SJ, Oparil. Converting-enzyme inhibitors increae converting enzyme mRNA and activity in endothelial cells. *Am J Phisiol* 263:C743-C749, 1992.
- Khayyall M, MacGregor J, Brown JJ. Increase of plasma renin substrate concentration after infusion of angiotensin in the rat *Clin Sci* 44:87, 1973.
- Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I: The progression of renal disease. *New Engl J Med* 318:1657-1666, 1988.
- Kohno M, Horio T, Ikeda M, Yokokawa K, Fukui T, Yasunari K, Kurihara N, Takeda T: Angiotensin II stimulates endothelin-1 secretion in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 42:860-866, 1992.
- Komuro J. Re-evaluation of fibroblast and fibroblast-like cells. *Anat Embryol*. 182:103-112, 1990.

- Konopka K, Perico N, Lapinski R, Remuzzi A, Sangalli F, Noris M, Aiello S, Colosio V, Remuzzi G. Abnormality of glomerular capillary permeability induced by angiotensin II in isolated perfused kidney is mediated by platelet-activating factor. *J Am Soc Nephrol*, 1995.
- Kopp JB, Bruggeman LA, Klotman PA. Extracellular matrix gene expression in experimental glomerulonephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2:609-617, 1993.
- Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 39:550-556, 1991.
- Lemley KV, Kriz W. Anatomy of the renal interstitium. *Kidney Int* 39:370-381, 1991.
- Lewis NP, Ferguson DR. [<sup>3</sup>H]-Angiotensin II binding to basolateral membranes from rat proximal tubule: effect of sodium intake and captopril. *J Endocrinol* 122:499-507, 1989.
- Lewis EJ, Hunsicker E, Bain RP. The effect of angiotensin converting enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 329:1456-1462, 1993.
- López-Armada MJ, Gomez-Guerrero C, Egido J. Immuno complexes stimulate the expression and synthesis of matrix proteins in cultured rat and human mesangial cells. Role of transforming growth factor- $\beta$ . (abstract) *J Am Soc Nephrol*. 25:812, 1994.
- Lowry OH: Protein measurement with the folin phenol reagent method. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
- Lyons, R.M., J. Keski-Oja, and H.L. Moses. Proteolytic activation of latent transforming growth factor- $\beta$  from fibroblast-conditioned medium. *J. Cell. Biol.* 106:1659-1665, 1988.
- Makita N, Iwai N, Inagami T, Badr KF. Two distinct pathways in the down regulation of type I angiotensin II receptor gene in rat glomerular mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 185:142-146, 1992.
- Malathi P, Preiser H, Fairclough P, Mallet P, Crane RK: A rapid method for isolation of kidney brush-border membranes. *Biochem Biophys Acta* 554:259-263, 1979.
- Marchetti J, Roseau A, Alhenc-Gelas F: Angiotensin converting enzyme and kinin-hydrolyzable enzyme along the rabbit nephron. *Kidney Int* 31:744-751, 1987.
- Marinides G. Angiotensin II stimulates DNA synthesis by mesangial cells and may enhance effects of PDGF. *J Am Soc Nephrol* 3:440, 1992.
- Martinez-Montero JC, Herrington CS, Stickland J. Model system optimising mRNA non-isotopic in situ hybridization: Riboprobe detection of lysozyme mRNA in archival gut biopsy specimens. *J Clin Pathol*. 44:835-839, 1991.
- Marrero MB, Paxton WC, Duff JL, Berk BC. Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269:10935-10939, 1995.
- Marx M, Sterzel B, Sorokin L. Renal matrix adhesion in injury and inflammation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2:527-535, 1993.
- Massagué J: The transforming growth-factor- $\beta$  family. *Ann Rev Cell Biol* 6:597-647, 1990.
- Mayer G, Lafayette RA, Oliver J, Deen WD, Myers BD, Meyer TW. Effects of angiotensin II receptor blockade on remnant glomerular permeability. *Kidney Int* 43: 346-353, 1993.
- Mené P, Simonson MS, Dunn MJ. Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev* 69:1347-1424, 1989.
- Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM: Reversing glomerular hypertension stabilizes established glomerular injury. *Kidney Int*. 31:752-759, 1987.

- Michel B, Grima M, Stephan D, Coquard C, Welsch C, Barthelmebs M, Imbs JL. Plasma and renin activity and changes in tissue angiotensin converting enzyme *J Hypertens.* 12:577-584, 1994.
- Mimran A, Insua A, Ribstein J, Bringer J, Monnier L: Comparative effect of captopril and nifedipine in normotensive patients with incipient diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 11:850-853, 1988.
- Momose N, Fukuo K, Morimoto S, Ogihara T: Captopril inhibits endothelin-1 secretion from endothelial cells through bradykinin *Hypertension* 21:921-924, 1993.
- Montero A, Rodriguez-Barbero A, López-Novoa JM. A role for platelet-activating factor in endothelin-1-induced rat mesangial proliferation. *Eur J Pharmacol*, 243:235-240, 1993.
- Morelli E, Loon N, Meyer TW, Peters W, Myers BD: Effects of converting-enzyme inhibition on barrier function in diabetic glomerulopathy. *Diabetes.* 39:76-82, 1990.
- Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Lee W, Zhang L, Yu H, Dzau VJ. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy: in vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *J Clin Invest* 94:978-984, 1994.
- Moriyama T, Fujiwara Y, Kaneto T, Xia C, Imai E, Kamada T, Ueda N. Angiotensin II stimulates interleukin-6 release from cultured mouse mesangial cells. *J.Am.Soc. Nephrol.* 6:95-101, 1995.
- Murphy TT, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of cDNA encoding the vascular type-I angiotensin receptor *Nature (London)* 351:233-236, 1991.
- Mulrow PJ. The intrarenal renin angiotensin system. *Cur Opin Nephrol Hypertens* 2:41-44, 1993.
- Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau JV: Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expression by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83:1419-1424, 1989.
- Nagel RB, Kneiser MR, Bulger RE, Benditt EP. Induction of smooth muscle characteristic in renal interstitial fibroblast during obstructive nephropathy. *Lab Invest* 29:422-427, 1973.
- Nagel RB, Bulger RE. Unilateral obstructive nephropathy in the rabbit. I. Late morphologic changes. *Lab Invest* 38:270-278, 1978.
- Nahman NS, Falkeinhaim ME, Frazer KM, Murry AR, Loenhardt K. Ligand binding to the type I angiotensin II cell surface receptor stimulates human mesangial cell fibronectin synthesis *J.Am.Soc. Nephrol.* 4:444, 1993.
- Neyses L, Nouskas J, Oberdorf S, Vetter H. Action of an ACE inhibitor on myocardial early growth response, *J Cardiovasc Pharmacol* 20(supplB):S12-S14, 1992.
- Neuringer JR, Brenner BM: Hemodynamic theory of progressive renal disease: A 10-year update in brief review. *Am J Kidney Dis.* 22: 98-104, 1993.
- Neuwirth R, Satriano JA, De Candido S, Clay K, Schlondorff D. Angiotensin II causes formation of platelet activating factor in cultured rat mesangial cells. *Circulation Research* 64:1224-1229, 1989.
- Nikolic-Patterson DJ, Lan HY, Hill PA, Atkins RC. Macrophages in renal injury. *Kidney Int* 45:S79-S82, 1994.
- Noble B, Ren K, Tavernes J, Dipirro J, Van Liew J, Dijkstra C, Janosy G, Poulter LW. Mononuclear cells in glomeruli and cytokines in urine reflect the severity of experimental proliferative immune complex glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol.* 80:281-287, 1990.
- Noble NA, Kagami S, Border WA: Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through activation of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) synthesis in cultured mesangial cells (abstract). *J Am Soc Nephrol* 4:661, 1993.

- Nuñez DJR, Taylor EA, Oh VMS, Schofield JP, Brown MJ. Endothelin-1 mRNA expression in the rat kidney. *Biochem J.* 275:817-819, 1991.
- Ohyama K, Seyer JM, Raghow R, Kang AH: Extracellular matrix phenotype of rat mesangial cells in culture. *J Lab Clin Med.* 116:219-227, 1990.
- Okamoto H, ohashi Y, Itoh N. Involvement of leukocyte and glucocorticoid in the acute phase of angiotensinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 145:1225, 1987.
- Okuda S, Languino LR, Rouslahi E and Border WA. Elevated expression of transforming growth factor- $\beta$  and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J Clin Invest* 86:453-462, 1990.
- Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: a new class of orally active antihypertensive agents. *Science.* 196:441-443, 1977
- Ondetti MA, Cushman DW. Inhibitors of angiotensin converting enzyme. *In* *Biochemical Regulation of blood pressure* edited by Soffer RL. New York. John Wiley 165-169, 1981.
- Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ, Laurent GJ. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. *J Cell Sci.* 92:513-518, 1989.
- Ortiz A, Gomez-Chiarri M, Alonso J, Bustos C, Gomez-Guerrero C, Alonso J, López-Armada MJ, Gómez-Garre D, Palacios I, Ruiz-Ortega M, Gutierrez S, González E, and Egido J. The potential role of inflammatory and fibrogenic cytokines in the glomerular diseases. *J Lipid Mediator.* 9:55-74, 1994.
- Ortíz A, Alonso J, Gómez-Chiarri M, Lerma JL, Seron D, Condomi E González E. Egido J. Fibronectin decreases glomerular lesions and synthesis of TNF $\alpha$ , PAF and fibronectin in proliferative glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol.* 101:334-341, 1995.
- Osborne M, Meyer P, Droz B, Morel F: Localisation intrarénale de l'angiotensine tritiée dans les cellules mesangiales par radiographie. *CR Acad Sci (Paris)* 276:2457-2460, 1973.
- Patel R, Ansarai A. Serum angiotensin converting enzyme activity in patients with chronic renal failure on long term hemodialysis. *Clin Chim Acta* 92:491-495, 1979.
- Pimentel JL, Martinez-Maldonado M, Wilcox JN, Wang S, Chuying L. Regulation of renin-angiotensin system in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 44:390-400, 1993.
- Pimentel JL, Montero A, Wang S, Yosipiv I, ElDahr S, Martinez-Maldonado M. Sequential changes in renal expression of renin angiotensin system genes in acute unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 48:1247-1253, 1995.
- Praga M, Hernández E, Montoyo C, Andrés A, Ruilope LM, Rodicio JL: Long-term beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with nephrotic proteinuria. *Am J Kidney Dis.* 20:240-248, 1992.
- Quirós J, González-Cabrero J, Egido J, Herrero-Beaumont G, Martínez Montero CG. Beneficial effect of fibronectin administration on chronic nephritis in rats. *Arthritis Rheum.* 33:685-692, 1990.
- Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int.* 26:137-143, 1984.
- Rakugi H, Nakamura M, Saito H, Higaki J, Ogihara T. Endothelin inhibits renin release from isolated glomeruli. *Biochem Biophys Res Comm.* 155:1244-1247, 1988.
- Rakugi H, Kim DK, Krieger JE, Wang Ds, Dzau VJ, Pratt RE. Induction of angiotensin converting enzyme in the neointima after vascular injury. *J Clin Invest.* 93:339-346, 1994.

- Ray PE, Bruggeman LA, Horikoshi S, Aguilera G, Klotman PE. Angiotensin II stimulates human fetal mesangial cell proliferation and fibronectin synthesis by binding to AT<sub>I</sub> receptors. *Kidney Int.* 45:177-184, 1994.
- Remuzzi A, Perticucci E, Ruggenenti P, Mosconi L, Limonta M, Remuzzi G. Angiotensin converting enzyme inhibition improves glomerular size-selectivity in IgA Nephropathy. *Kidney Int* 39:1267-1273, 1991
- Remuzzi A, Ruggenenti P, Mosconi L, Pata V, Viberti G, Remuzzi G. Effect of low-dose enalapril on glomerular size-selectivity in human diabetic nephropathy. *J Nephrol* 6:36-43, 1993a.
- Remuzzi G, Begnini A. Endothelins in the control of cardiovascular and renal functions. *Lancet.* 342:589-593, 1993b.
- Remuzzi A, Begnini A, Malanchini B, Bruzzi I, Foglieni C, Remuzzi G. ACE inhibition prevents renal failure and death in uninephrectomized MWF/Ztn rats. *Kidney Int* 47:1319-1326, 1995.
- Roberts AB, McCune BK and Sporn MB. TGF- $\beta$ : Regulation of extracellular matrix. *Kidney Int* 41:557-559, 1992.
- Rodemann HP, Müller GA. Characterization of human renal fibroblast in health and disease II: in vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblast from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 17:684-686, 1991.
- Ron D, Brasier AR, Wright KA et al. An inducible 50-kilodalton NF kappa B-like protein and a constitutive protein both bind the acute-phase response element of angiotensinogen gene. *Mol Cell Biol.* 10:1023-1032, 1990.
- Rosenberg ME, Hostteter TH. Effect of angiotensin II on early growth genes in the kidney (abstract). *J Am Soc Nephrol* 1:426, 1990.
- Rosenberg ME, Hostetter TH, Kren S, Chmielewski D: In vivo effect of angiotensin II and norepinephrine on early growth response genes in the rat kidney. *Kidney Int* 43:601-609, 1993.
- Rosenberg ME, Smith LJ, Correa-Rotter R, Hostetter TH. The paradox of the renin angiotensin system in chronic renal disease. *Kidney Int.* 45: 403-410, 1994.
- Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet derived growth factor. *Cell* 46:155-169, 1986.
- Rovin BH, Yoshimura T, Tan L. Cytokine-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured human mesangial cells. *J Immunol.* 148:2148-2153, 1992.
- Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Hebert CA. Activation of nuclear factor-kB correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int.* 48:1263-1271, 1995.
- Ruef C, Budde K, Lacy J. Interleukin-6 is an autocrine growth factor for mesangial cells. *Kidney Int.* 38:249-257, 1990.
- Ruff MA, Gifford GE: Purification and physico-chemical characterization of rabbit tumor necrosis factor. *J. Immunol* 125:1671-1677, 1980.
- Ruiz-Ortega M, D Gómez-Garre, R Alcazar, I Palacios, C Bustos, S González, E. González, J. Plaza, and J. Egido. Involvement of Angiotensin II and Endothelin on matrix protein production and renal sclerosis. *J. Hypertens.* 12 (suppl 4) S51-S58, 1994.
- Ruiz-Ortega M, Largo R, Bustos C, Gómez-Garre D, E. González, J. Plaza, and J. Egido. Platelet activating factor (PAF) stimulates the expression and synthesis of extracellular matrix proteins in cultured renal cells. (abstract) *J Soc Am Nephrol.* 5:683, 1994.

- Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Cir Res* 73:413-423, 1993.
- Sajid M, Graves K, Rajaraman S. Mediators of progressive glomerular injury: evidence for interplay of interleukin-1 $\beta$  and angiotensin II. (abstract) *J Am Soc Nephrol* 3:613, 1992.
- Saltis J, Agrotis A, Bobik A: Transforming growth factor- $\beta$ 1 enhances the proliferative effects of epidermal growth factor on vascular smooth muscle from the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*. S6: S184-S185, 1991.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis F. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York Press, 1989.
- Sánchez-Crespo M, Alonso F, Barat A, Egido J: Rat serum sickness: possible role of inflammatory mediators allowing deposition of immune complexes in the glomerular basement membrane. *Clin Exp Immunol* 49:631-638, 1982.
- Satriano JA, Hora K, Shan Z, et al. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells. *J Immunol* 150:1971-1978, 1993.
- Savage S, Schrier RW: Progressive renal insufficiency: The role of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Adv Int Med* 37: 85-101, 1991.
- Schorb W, Booz GW, Dostal DE, Conrad KM, Chang KC, Baker KM: Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Cir Res* 72:1245-1254, 1993.
- Schlondorff D, Neuwirth R: Platelet-activating factor and the kidney. *Am J Physiol* 251:F1-F11, 1986.
- Schlondorff D, Goldwasser P., Neuwirth R, Satriano JA, Clay K: Production of platelet activating factor in glomeruli and cultured glomerular mesangial cells *Am J Physiol* 251:F1123-F1127, 1987.
- Schlondorff D. The role of chemokines in the initiation and progression of renal disease. *Kidney Int* 47:S44-S47, 1995.
- Schreck R, Meier B, Männel DN, Dröge W, Baeuerle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor  $\kappa$ B activation in intact cells. *J Exp Med*. 175:1181-1186, 1992.
- Schulz W, Hagler H, Buja LM. Ultrastructural localization of angiotensin converting enzyme and neutral metalloendopeptidase in the proximal tubule of the human kidney. *Lab Invest*. 59:789-797, 1988.
- Schunkert H, Ingerfinger JR, Hirsch AT, Pinto Y, Remme WJ, Jacob B, Dzau VJ. Feedback regulation of angiotensin converting enzyme activity and mRNA levels by angiotensin II. *Circulation* 72:312-318, 1993.
- Sechi LA, Grady EF, Griffin CH, Kalinyar JE, Schambelan M. Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rats and human kidney. *Am J Physiol*. 262:F236-F240, 1992.
- Sekaly MG, Arant BS, Seney FD. Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest*. 86:1352-1357, 1990.
- Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47:921, 1986.
- Sharma K, Ziyadeh FN: Renal hypertrophy is associated with upregulation of TGF- $\beta$ 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. *Am J Physiol* 265:F1094-1101, 1994.
- Shimada K, Yakazi Y. Binding sites of angiotensin II in human mononuclear leukocytes. *J Biochem*. 1978;84:1013-1015.

- Shukla SD. Platelet-Activating Factor receptors and signal transduction mechanism. *FASEB J* 6:2296-2301, 1992.
- Sibony M, Casc JM, Soubrier F et al., Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin converting enzyme. *Hypertension*. 21:827-835, 1993.
- Simonson MS, Wann S, Mené P, Dubyak GR, Kester M, Nakazato Y, Sedor JR, Dunn MJ. Endothelin stimulates phospholipase C, Na/H exchange, c-fos expression and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 83: 708-712, 1989.
- Smith R D, Chui A T, Wong P C, Herblin W, Timmermans P B M W M: Pharmacology of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:135-65, 1992.
- Stahl RAK, Thaïs F, Disser M, Helmchen U, Hora K, Schondorff D. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti-thymocyte antibody induced glomerulonephritis. *Kidney Int.* 44:1036-1047, 1993.
- Streeten DHP, Anderson GH, Freiberg JM, Dalakos TG. Use of an angiotensin II antagonist (saralasin) in the recognition of angiotensinogenic hypertension *N Engl J Med* 292:657-662, 1975.
- Striker LM-M, Killen PD, Chie E, Striker GE: The composition of glomerulosclerosis. I. Studies in focal sclerosis, crescentic glomerulonephritis and membranoproliferative glomerulonephritis. *Lab Invest.* 51:181, 1984.
- Striker GE, Striker LJ: Biology of disease: Glomerular cell culture. *Lab Invest* 53:123-128, 1985.
- Striker LJ, Doi T, Elliot S, Striker GE. The contribution of glomerular mesangial cells to progressive glomerulosclerosis. *Semin Nephrol* 9:318-328, 1989.
- Strutz F. Novel aspects of renal fibrogenesis *Nephrol Dial Transpl* 10:1526-1532, 1995.
- Studer RK, Craven PA, DeRubertis FR. Thromboxane stimulation of mesangial cell fibronectin synthesis is signalled by protein kinase C and modulated by cGMP. *Kidney Int* 46:1074-1082, 1994.
- Studer RK, Negrete H, Craven PA, DeRubertis FR. Protein kinase C signals thromboxane induced increases in fibronectin synthesis and TGF- $\beta$  bioactivity in mesangial cells. *Kidney Int.* 48:422-430, 1995.
- Studdy PR, Lapworth R, Bird R. Angiotensin converting enzyme and its clinical significance-a review. *J Clin Pathol* 36:983, 1986.
- Sraer J D, Sraer J, Ardaillou R, Mimoun O. Evidence for renal glomerular receptors for angiotensin II. *Kidney Int.* 6:241-246, 1974.
- Takasaki I, Chobanian AV, Brecher P. Biosynthesis of fibronectins by rabbit aorta. *J Biol Chem* 266:17686-17694, 1991.
- Takeuchi K, Nakemura N, Cook NS, Pratt RE, Dzau VJ. Angiotensin II can regulate gene expression by the AP-1 binding sequence via a protein kinase C-dependent pathway. *Biochem Biophys Commun Res.* 172:1189-1194, 1990.
- Tigerstedt R, Bergman PG. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol*, 8:223-271, 1899.
- Timmermans P B M W M, Chui A T, Herblin W F, Wong P C, Smith R D. Angiotensin II receptor subtypes. *Am J Hypertens.* 5:406-410, 1992.
- Tsuda T, Hamamori Y, Yamashita T, Fukumoto Y, Takai Y. Involvement of three intracellular messenger system, protein kinase C, Ca<sup>2+</sup> ion and cyclic AMP in the regulation of fos gene expression in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.* 208:39-42, 1986.

- Ueda A, Okuda K, Ohno S, Shirai A, Igarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T. NF- $\kappa$ B and SP1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein 1 gene. *J Immunol.* 1994;153:2052-2063.
- Villareal FJ, Kim NN, Ungab GD, Printz MP, Dillmann WH. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation* 88:2849-2861, 1993.
- Warworth A, Brodgen R. Quinapril. A review of its pharmacological properties and therapeutics efficacy in cardiovascular disorders. *Drugs.* 41:378-399, 1991
- Webb ML, Dickinson KEJ, Delaney CL, Liu ECD, Serafino R, Cohen RB, Mosnhozadegan H, Moreland S. The endothelin receptor antagonist, BQ123, inhibits angiotensin II-induced contractions in rabbit aorta. *Biochem Biophys Res Comm* 185:887-892, 1992.
- Weber H, Taylor DS, Molloy CJ: Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. *J Clin Invest* 93:788-798, 1994.
- Wetzels JFM, Mentzel S, de Jong AS, Dijkman HBPM, van Son JPHF, Koene RAP, Assmann KJM. Angiotensin II mediates the upregulation of aminopeptidase A mRNA expression in an experimental model of membranous glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 1995.
- Weiss MA, Ooi BS, Engvall E, Rouslathi E. Immunofluorescence t localization of fibronectin in the human kidney *Lab Invest* 41:340-347, 1979.
- Wiggins R, Goyal M, Merritt S, Killen PD. Vascular adventitial cell expression of collagen type I messenger ribonucleic acid in antiglomerular membrane antibody-induced crescentic nephritis in rabbit. *Lab Invest.* 68: 557-565, 1993.
- Wilson AP. Cytotoxicity and viability assays. *Animal cell culture.* Editor RI Freshney. IRL press Oxford 183-216, 1986.
- Wolthius A, Boes A, Brond J: Cell density modulates growth, extracellular matrix, and protein synthesis of cultured rat mesangial cells. *Am J Pathol* 143:1209-1219, 1993.
- Wolf G, Killen PD, Neilson EG. Intracellular signalling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II-induced cellular hypertrophy in cultured proximal tubular cells. *Mol Biol Cell* 2:219-227, 1991.
- Wolf G, Haberstroh U, Neilson EG. Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *Am. J. Pathol.* 140:95-107, 1992.
- Wolf G, Neilson EG: Angiotensin II as a renal growth factor. *J Am Soc Nephrol.* 3:1531-1540, 1993 a.
- Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II as a hypertrophogenic cytokine for proximal tubular cells. *Kidney Int* 43, Supp 39:S100-S107, 1993 b.
- Wolf G, Zahner G, Mondorf U, Schoeppe W, Stahl R: Angiotensin II stimulates cellular hypertrophy of LLC-PK1 cells through the AT1 receptor. *Nephrol Dial Transplant* 8:128-133, 1993 c.
- Wolf G, Ziyadeh FN, Schroeder R, Zahner G, Stahl RAK. Angiotensin II induces mitogen-activated protein kinase 2 (MAP2) and stimulates proliferation of rat glomerular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 1995.
- Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF- $\beta$ 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 45:916-927, 1994.
- Yamamoto Y, Yamaguchi T, Shimamura M, Hazato T. Angiotensin III is a new chemoattractant for polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 193:1038-1043, 1993a.
- Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Rouslathi E, Border WA. Expression of transforming growth factor- $\beta$  is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1814-1818, 1993.



- Yee J, Kuncio GS, Neilson EG. Tubulointerstitial injury following glomerulonephritis. *Semin Nephrol* 11:361-366, 1991.
- Yoshida H, Nakamura M: Inhibition by angiotensin converting enzyme inhibitors of endothelin secretion from cultured human endothelial cells. *Life Science* 50:195-200, 1992?
- Yoshioka K, Takemura T, Murakami K, Okada M, Hino S, Miyamoto H, Maki S. Transforming growth factor- $\beta$  protein and mRNA expression in glomeruli in normal and in diseased human kidneys. *Lab Invest* 68:154-163, 1993.
- Yoshimura T, Yuhki N. Neutrophil attractant/activation protein-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in rabbit. cDNA cloning and their expression in spleen cells. *J Immunol* 146:3483-3488, 1991.
- Zachariae COC, Anderson AO, Thompson HL, Apella E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Matsushima K. Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MAC) purified from a human fibrosarcoma cell line. *J Exp Med* 171:2177-2182, 1990.
- Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res*. 1995;76:980-986.

## **APENDICES**

## ABREVIATURAS

AB	Anticuerpo
Act	Actinomicina
AIg	Agregados solubles de inmunoglobulinas
Ang	Angiotensina
Ao	Angiotensinógeno
ATCC*	Colección americana de cultivos tipados
AT	Receptor de angiotensina
AP-1	Promotor inducible por PMA
BSA*	Albúmina de suero bovino
CHX	Cicloheximida
CM	Células mesangiales
COL	Colágeno
Cy*	Ciclofilina
cDNA*	Acido desoxirribonucleico complementario
DNA*	Acido desoxirribonucleico
DE	Desviación estándar
DEPC	Diethyl pirocarbonato
DG	Diacilglicerol
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima de conversión de Angiotensina
EDTA*	Acido etilendiamino treaacético
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ET	Endotelina
FN	Fibronectina
HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IP-10	Proteína inducible por interferón 10
kDa	Kilodalton
kb	Kilobase
LPS	Lipolisacárido bacteriano

mRNA*	Acido ribonucleico mensajero
MCP-1*	Proteína quimiotáctica de monocitos
NEM	N-etil maleimida
NF	Factor nuclear
NO	Oxido nítrico
OVA	Ovoalbúmina
PAF*	Factor activador de plaquetas
PAGE*	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pB	Pares de bases
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDTC	Pirrolidin ditiocarbamato
PG	Prostaglandinas
PKC	Proteína quinasa C
PMA*	Forbol 12-miristato 13-acetat
PMSF*	Fenilmetilsulfonil fluoruro
RAS*	Sistema Renina-Angiotensina
RNA*	Acido ribonucleico
RT	Reacción de transcripción inversa
SDS*	Duodecil sulfato sódico
STF	Suero de ternera fetal
TCA	Acido tricloroacético
TGF*	Factor de crecimiento transformante
TNF*	Factor de necrosis tumoral
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TxA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>

\* Abreviaturas utilizadas según la terminología inglesa

**TAMPONES Y SOLUCIONES****TAMPON CARBONATO/BICARBONATO 0.1 M**

NaHCO<sub>3</sub> 100 mM

NaCl 500 mM

Ajustar a pH 8.5 con una solución:

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM

NaCl 500 mM

**TAMPON DULBECCO ESTERIL**

KCl 2.6 mM

NaCl 137 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.0 mM

glucosa 5.6 mM

Ajustar a pH 7.5-7.6 con NaOH

Esterilizar en autoclave (130°C, 1 Bar, 20 min)

**TAMPONES DE ELECTROFORESIS DE PROTEINAS**

- de muestras:

Tris 0.08 M pH 6.8

glicerol 10%

SDS 1%

azul de bromofenol 0.005%

- de desarrollo:

Tris 0.025 M

glicina 1.92 M

SDS 1%

**TAMPONES DE ELECTROFORESIS DE RNA**

- desnaturizante:

formamida desionizada 50%

formaldehído 6%

MOPS 1x

- de muestras:

glicerol 30%

azul de bromofenol 0.25%

xilen cianol 0.25%

**TAMPON FOSFATOS 0.5 M**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	390 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	110 mM

**TAMPON FOSFATO-SALINO (PBS)**

NaCl	150 mM
fosfatos 0.5 M	10 mM (20 ml/l)
Comprobar que el pH está 7.3	

**TAMPON HEPES-SALINO (HEPES)**

HEPES	20 mM
NaCl	150 mM
KCl	5 mM
Ajustar a pH 7.4 con NaOH	

**TAMPON KREBS-HENSELEIT-HEPES (KHH)**

NaCl	130 mM
KCl	5.3 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
glucosa	5.5 mM
HEPES	20 mM
BSA	0.5 %

Ajustar a pH 7.3 con KOH

**SOLUCION DE LISIS PARA EXTRACCION DE RNA**

isotiocianato de guanidina	4 M
citrato sódico pH 7.0	25 mM
N-laurilsarcosina	0.5 %
β-mercaptoetanol	0.1 M

**SOLUCION DE DENHART**

Ficoll	0.02 %
BSA	0.02 %
PVP	0.02 %

**SOLUCIÓN 20X SSC**

NaCl	3 M
citrato sódico	0.3 M